

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM REVERZIBILNÍ ADSORPCE NUKLEOVÝCH KYSELIN NA
PEVNÝCH NOSIČÍCH

DIZERTAČNÍ PRÁCE

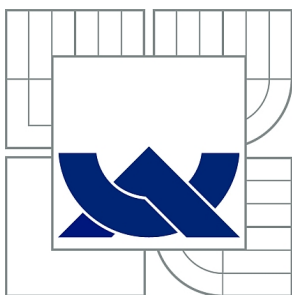
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. ŠTĚPÁNKA TRACHTOVÁ

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM REVERZIBILNÍ ADSORPCE NUKLEOVÝCH Kyselín NA PEVNÝCH NOSIČÍCH

STUDY OF REVERSIBLE ADSORPTION OF NUCLEIC ACIDS ON SOLID SURFACES

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. ŠTĚPÁNKA TRACHTOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. BOHUSLAV RITTICH, CSc.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce:	FCH-DIZ0044/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Ing. Štěpánka Trachtová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (P2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901V021)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.	
Konzultanti:		

Název dizertační práce:

Studium reverzibilní adsorpce nukleových kyselin na pevných nosičích

Zadání dizertační práce:

Cílem práce bylo zhodnotit možnosti využití různých druhů magnetických i nemagnetických nosičů (polymerní magnetické neporézní částice na bázi PHEMA, nanočástice manganatého peroskvitu $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ pokryté vrstvou silikagelu a termosenzitivní poly(N-isopropylakrylamid) pro izolaci DNA z komplexních vzorků obsahujících PCR inhibitory. Reverzibilní adsorpce DNA na povrch pevných částic byla provedena ze systému vodné fáze složené z polyethylenglykolu (o různé molární hmotnosti) a chloridu sodného o různých koncentracích. Kvalita eluované DNA a přítomnost cílové DNA byla ověřena pomocí PCR a PCR v reálném čase. PCR v reálném čase byla použita i pro testování inhibičního vlivu nanočástic na PCR.

Termín odevzdání dizertační práce: 15.8.2011

Dizertační práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu dizertační práce. Toto zadání je přílohou dizertační práce.

Ing. Štěpánka Trachtová
Student(ka)

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.2.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Magneticky řízené separační techniky využívající pevné magnetické nosiče jsou řazeny mezi moderní separační metody urychlující a usnadňující dříve používané separační postupy. Použití magnetických nosičů je podmíněno přísnými požadavky na fyzikální a chemické vlastnosti nosičů, včetně nízké toxicity, biokompatibility.

Cílem této studie bylo zhodnotit možnosti využití různých polymerních magnetických neporézních nosičů P(HEMA-*co*-GMA), P(HEMA-*co*-GMA), PGMA funkcionalizovaných karboxylovými skupinami, nanonosičů manganatého peroskvitu $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ pokrytých vrstvou silikagelu a termosenzitivních poly(N-isopropylakrylamidových) mikronosičů - P(NIPAAm) pro izolaci DNA z komplexních vzorků obsahujících PCR inhibitory (různé druhy potravin a vzorků získaných z životního prostředí).

Byla vypracována metoda reversibilní absorpce nukleových kyselin na povrch pevných nosičů v prostředí systému vodné fáze složené z 16% PEG 6000 a 2M NaCl z různých typů komplexních vzorků (mléčných výrobků, mléčných náhrad a probiotických doplňků stravy, myší stolice). Byly optimalizovány podmínky (pH elučního pufru, teplota, doba eluce) uvolnění adsorbované DNA do elučního pufru. Kvalita eluované DNA a přítomnost cílové DNA byly úspěšně ověřeny pomocí PCR a PCR v reálném čase za využití primerů specifických pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*. PCR v reálném čase byla použita pro testování případného inhibičního vlivu přítomných nanonosičů v PCR porovnáním účinnosti amplifikace purifikované DNA v přítomnosti nanonosičů s DNA bez nanonosičů.

KLÍČOVÁ SLOVA

izolace DNA
magnetické nosiče
polymerázová řetězová reakce (PCR)
metoda reversibilní adsorpce na pevné fázi

ABSTRACT

Magnetically driven separation techniques using magnetic solid carriers are one of modern methods to speed up and facilitate the previously used separation and purification procedures. The use of magnetic particles in biology imposes strict requirements on physical, and chemical properties of the particles, including low toxicity, biocompatibility and non-interference with the chemical environment in diagnostics.

The aim of this study was to evaluate carboxyl-functionalised magnetic non-porous P(HEMA-*co*-GMA), P(HEMA-*co*-EDMA), PGMA, silica-coated lanthanum manganese perovskite $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ and thermosensitive poly(*N*-isopropylacrylamide) microspheres – P(NIPAAm) for DNA isolation from different types of complex food and environmental samples containing PCR inhibitors. The solid-phase reversible immobilisation (SPRI) of nucleic acids on microsphere surface and the release of adsorbed DNA were optimised. DNA from real samples (milk products and probiotic food supplements, mouse faeces) was apparently adsorbed on solid particles from the aqueous phase system composed of 16% PEG 6000 and 2M NaCl. The conditions of the subsequent release adsorbed DNA to the elution buffer (pH of elution buffer, temperature and time of elution) were optimized. The quality of eluted DNA and the presence of target DNA were examined by PCR and q-PCR using domain-specific *Bacteria* and genus-specific *Lactobacillus* primer set. Real-time PCR was used for an estimation of the PCR interference by comparing the amplification efficiencies of purified DNA containing solid nanoparticles with the DNA standards free of any nanoparticles.

KEY WORDS

DNA isolation
magnetic particles
polymerase chain reaction (PCR)
solid-phase reversible immobilisation (SPRI)

Trachtová, Š.: *Studium reversibilní adsorpce nukleových kyselin na pevných nosičích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 138 s. Vedoucí dizertací práce: Doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Dizertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího dizertační práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis doktoranda

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu dizertační práce doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. za odborné vedení, množství cenných rad a připomínek. Své poděkování bych také ráda vyjádřila doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za její vedení a všestrannou podporu nejen při řešení dizertační práce. Vřelý dík patří také mé rodině, která mi byla vždy oporou.

OBSAH

ÚVOD.....	9
TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 MAGNETICKÉ NOSIČE	11
1.1 Vlastnosti magnetických nosičů	11
1.1.1 Magnetické jádro	12
1.1.2 Povrchová úprava magnetických nosičů	12
1.1.2.1 Imobilizace biologicky aktivních látek na magnetických nosičích	13
1.2 Magnetické polymerní nosiče	14
1.2.1 Techniky přípravy polymerních nosičů	14
1.2.2 Charakteristika magnetických polymerních nosičů	15
1.3 Monodisperzní termosenzitivní poly (<i>N</i> - isopropylakrylamidové) nosiče	16
1.4 Magnetické nosiče na bázi silikagelu	18
1.4.1 Magnetické nanonosiče manganatého peroskviu pokryté vrstvou silikagelu	19
2 SEPARACE NUKLEOVÝCH KYSELIN POMOCÍ DVOUFÁZOVÉHO SYSTÉMU	19
2.1 Struktura a vlastnosti deoxyribonukleové kyseliny	20
2.1.1 Kondenzace DNA	21
2.1.2 Denaturace a renaturace DNA	22
2.2 Dvoufázové vodné systémy	22
2.3 Adsorpce DNA na povrch nosičů a její eluce	23
3 AMPLIFIKACE DNA	24
3.1 Molekulárně diagnostické metody	24
3.1.1 Polymerázová řetězová reakce	24
3.1.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	25
3.1.2.1 Princip kvantifikace pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase	26
3.1.3 Metoda restrikční analýzy amplifikované ribosomální DNA	28
3.2 Inhibitory PCR a eliminace jejich vlivu	28
3.3 Metoda rozlišení živých a mrtvých buněk	30
CÍL PRÁCE	34
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	35
4 MATERIÁL.....	35
4.1 Bakteriální kultury	35
4.2 Purifikovaná bakteriální DNA	35
4.3 Polymerní magnetické nosiče	35
4.3.1 Vlastnosti polymerních nosičů	35
4.3.2 Komerčně dodávané magnetické nosiče	36
4.4 Přístroje	36
4.5 Testované výrobky	37
4.5.1 Preparát SanyDuo	37
4.5.2 Vzorky myší stolice	37
4.5.3 Probiotické mléčné výrobky, dopňky stravy	37
5 METODY.....	39
5.1 Kultivace mikroorganismů	39
5.1.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	39
5.1.2 Rod <i>Bifidobacterium</i>	39
5.1.3 Rod <i>Bacillus</i>	39
5.2 Stanovení růstové křivky	39
5.3 Příprava hrubých lyzátů buněk	40
5.3.1 Příprava hrubého lyzátu buněk z bakteriálních kultur	40

5.3.2	Příprava hrubého lyzátu buněk z mléčných výrobků	40
5.3.3	Příprava hrubého lyzátu buněk ze stolice myší	40
5.3.4	Příprava hrubého lyzátu buněk z výrobku SanyDuo	40
5.4	Izolace DNA	41
5.4.1	Izolace DNA metodou fenolové extrakce a srážení DNA ethanolem	41
5.4.2	Izolace DNA komerčními kity	41
5.4.3	Izolace DNA komerčními magnetickými částicemi	41
5.4.4	Izolace DNA metodou magnetické separace	41
5.4.4.1	Optimalizace metody reversibilní adsorpce DNA na pevných nosičích	42
5.4.4.2	Optimalizace podmínek eluce DNA z nosičů	43
5.4.4.3	Optimalizace podmínek magnetické separace za použití nosičů peroskvit	43
5.4.4.4	Izolace DNA z reálných vzorků magnetickými nosiči	44
5.4.4.5	Izolace DNA pomocí termosensitivních nosičů	45
5.5	Stanovení koncentrace a čistoty DNA	45
5.6	Amplifikace DNA	46
5.6.1	Konvenční polymerázová řetězová reakce	46
5.6.2	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	48
5.6.3	Restrikční analýza amplifikované ribosomální DNA	48
5.7	Inhibiční vliv magnetických nosičů na průběh amplifikace DNA	49
5.8	Agarosová gelová elektroforéza DNA a detekce produktů PCR	49
5.9	Metoda rozlišení živých a mrtvých buněk	50
5.9.1	Ověření působení EMA na DNA	50
5.9.2	Optimalizace koncentrace a doby působení EMA na buňky	50
5.9.3	Separace DNA po působení EMA pomocí magnetických nosičů	50
5.9.4	Porovnání působení EMA a PMA	51
5.9.5	Aplikace působení EMA-PCR na reálné vzorky	51
VÝSLEDKY A DISKUZE		52
6 OPTIMALIZACE PODMÍNEK REVERSIBILNÍ ADSORPCE DNA NA PEVNÉ NOSIČE		52
6.1	Testování pořadí komponent v separační směsi	52
6.2	Testování vhodné koncentrace komponent separační směsi	54
6.2.1	Vliv molekulové hmotnosti a koncentrace polyethylenglykolu	55
6.2.2	Vliv koncentrace polyethylenglykolu a chloridu sodného	55
6.3	Eluce DNA z nosičů	55
6.3.1	Doba eluce DNA	55
6.3.2	Teplota eluce a pH elučního pufru	57
6.4	Vliv magnetických nosičů	57
6.4.1	Koncentrace magnetických nosičů v separační směsi	57
6.4.2	Vliv obsahu karboxylových skupin na izolaci DNA	58
6.4.3	Testování různých typů magnetických polymerních nosičů	58
6.5	Diskuze	59
7 INTERFERENCE MAGNETICKÝCH NOSIČŮ V PCR		61
7.1	Magnetické polymerní nosiče	61
7.2	Termosensitivní nosiče	63
7.3	Nanočástice manganatého peroskvitu	63
7.4	Diskuze	64
8 APLIKACE MAGNETICKÝCH NOSIČŮ PŘI IZOLACI DNA Z REÁLNÝCH VZORKŮ		66
8.1	Využití magnetických nosičů při izolaci DNA z mléčných výrobků	66
8.1.1	Diskuze	68

8.2	Využití magnetických nosičů při izolaci DNA ze stolice myší	68
8.2.1	Izolace DNA ze vzorků stolice myší	68
8.2.2	Amplifikace DNA a detekce PCR produktů	69
8.2.2.1	Konvenční polymerázová řetězová reakce	69
8.2.2.2	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	70
8.2.3	Diskuze	71
8.3	Využití magnetických nosičů při analýze DNA bakterií rodu <i>Bacillus</i>	72
8.3.1	Diskuze	73
9	REVERSIBILNÍ ADSORPCE DNA NA NOSIČE PEROSKVIT	75
9.1	Optimalizace metody	75
9.2	Izolace DNA nosiči peroskvitu z mléčných výrobků	77
9.3	Diskuze	80
10	REVERSIBILNÍ ADSORPCE DNA NA TERMOSENZITIVNÍ NOSIČE	81
10.1	Testování schopnosti separace nukleových kyselin	81
10.2	Izolace DNA magnetickými termosensitivními nosiči	82
10.3	Izolace DNA z reálných vzorků pomocí nosiče NIP 182	83
10.4	Diskuze	84
11	VYUŽITÍ MAGNETICKÝCH NOSIČŮ PRO OPTIMALIZACI METODY EMA-PCR.	85
11.1	Optimalizace podmínek působení EMA	85
11.1.1	Působení EMA na DNA	85
11.1.2	Působení EMA na bakteriální buňky	86
11.2	Purifikace DNA metodou magnetické separace	86
11.2.1	Srovnání metody lyze buněk	87
11.3	Aplikace optimalizované metody EMA-PCR na reálné vzorky	88
11.4	Porovnání PMA-PCR a EMA-PCR	89
11.5	Diskuze	90
ZÁVĚR		92
PŘEHLED LITERATURY		94
PŘÍLOHY		101
12 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ		101
13 STRUČNÝ ŽIVOTOPIS AUTORA		103
14 SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA		104
15 PLNÉ ZNĚNÍ VYBRANÝCH PUBLIKACÍ		107

ÚVOD

Stanovení nukleových kyselin využívající metodu polymerázové řetězové reakce (PCR) se v posledních desetiletích stalo významným diagnostickým nástrojem analýzy mikroorganismů. Citlivost PCR metody může být ovlivněna, zejména u komplexních biologických vzorků (krev, stolice, potraviny apod.), přítomností extracelulárních či intracelulárních inhibitorů [1]. Přítomnost těchto látek snižuje účinnost amplifikace nebo je příčinou falešně negativních výsledků. Hlavním požadavkem technologií pracujících s DNA je získání DNA v dostatečném množství a zejména vhodné kvality. Základem aplikací založených na detekci bakteriální DNA v biologickém materiálu je proto výběr vhodné metody izolace DNA, nejčastěji je využívána:

- fenol-chloroformová extrakce DNA a srážení ethanolem [2]
- chromatografické metody [3], [4]
- selektivní nebo neselektivní adsorpce DNA nebo cílových buněk na povrch pevných nosičů.

Klasické metody izolace DNA často pracují s toxickými organickými rozpouštědly, vyžadují časově náročnou centrifugaci a nelze je v dostatečné šíři automatizovat. Taká je není možné použít například pro izolaci nukleových kyselin z velmi malého množství vzorku. Technikou odstraňující tyto nedostatky je metoda magnetické separace využívající pevné nano- a mikro-superparamagnetické nosiče.

Spojením magnetických nosičů (magnetické nanonosiče s rozměrem pod 10 nm nebo magnetické mikronosiče) s biologicky aktivní látkou lze dosáhnout unikátních vlastností získaných materiálů. Magnetické vlastnosti nano/mikro-nosičů spolu s jejich velkým povrchem (řádově $100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) umožňujícím navázat velké množství ligandů, jsou podstatou jejich využití jako efektivních nosičů pro rychlou a účinnou imobilizaci a separaci biologicky aktivních látek. [5] S výhodou jsou jako magnetické materiály využívány superparamagnetické látky, které magnetické vlastnosti vykazují pouze v přítomnosti magnetického pole, bez jeho působení se neshlukují a vytvářejí homogenní suspenzi [6]. Magnetické nosiče tvořené superparamagnetickými materiály, lze snadno a rychle odstranit i z heterogenních reakčních směsí působením magnetického pole. Díky tomu jsou řazeny mezi vysoce perspektivní materiály, které jsou stále častěji využívány v celé řadě, zejména separačních nebo katalytických aplikacích.

Metoda magnetické separace může být použita k izolaci prokaryotických i eukaryotických buněk, buněčných organel a biologicky aktivních látek (nukleové kyseliny, proteiny, xenobiotika) i ze složitých biologických systémů, jako jsou buněčné suspenze (hrubé lyzáty buněk [7], [8], [9]), fermentační média, komplexní reálné vzorky, apod.. Metoda je založena na selektivní, nebo neselektivní adsorpci cílových buněk a molekul pomocí pevných nosičů na bázi oxidu křemičitého či polymerních nosičů [3], [4], [10]. Základní využití neselektivní adsorpce DNA na povrch nosičů představuje metoda reversibilní imobilizace (adsorpce) na pevných nosičích (solid phase reversible immobilization (SPRI)). Alternativním postupem je technika imunomagnetické separace (IMS) za použití magnetických nosičů nesoucích specifické protilátky pro zachycení cílových buněk a jejich oddělení od okolního prostředí obsahujícího extracelulární inhibitory či konkurenční mikroflóru. Technika reversibilní imobilizace (SPRI) i imunomagnetické separace (IMS) může být účinně kombinována s polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) - (SPRI-PCR) [11], respektive (IMS-PCR) [10].

V porovnání s konvenčními izolačními metodami je práce s magnetickými nosiči rychlá, jednoduchá, dostatečně citlivá, bezpečná [12] a cílová látka, např. DNA je získávána ve vysokém

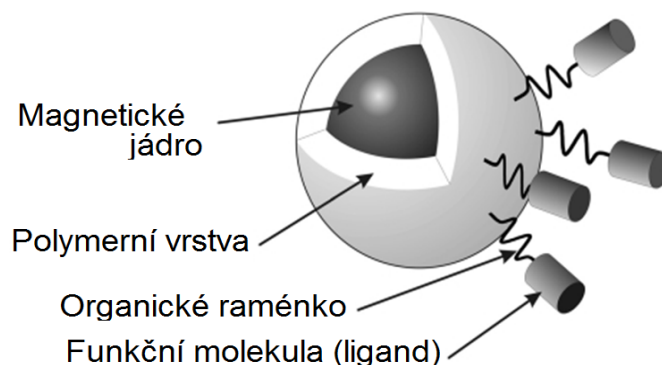
výtěžku a čistotě [13]. Výhodu představuje zejména možnost cílené manipulace působením vnějšího magnetického pole [5] a možnost automatizace celého procesu, díky čemuž je v plné míře využitelná nejen v laboratorních podmínkách, ale také v každodenní výrobní praxi. Nezanedbatelným pozitivem je snadné oddělení cílové látky (např. DNA) od kontaminantů a zbytků buněčné hmoty [7]. Magnetické nano- a mikronosiče nalézají rovněž uplatnění při cíleném transportu léčiv [14].

TEORETICKÁ ČÁST

1 MAGNETICKÉ NOSIČE

Magnetické nosiče jsou tvořeny kombinací organické polymerní matrice a anorganického jádra, které zajišťuje magnetické vlastnosti nosičů (Obrázek 1).

Polymerní vrstva chrání vnitřní magnetické jádro před přímým kontaktem s analytem, nespecifickými interakcemi, umožňuje úpravu povrchu nosičů funkcionalizací a následnou imobilizaci cílové molekuly. Povrchová úprava magnetických jader je nutná nejen z důvodu stabilizace nosičů, ale především zajišťuje biokompatibilitu nosičů. Magnetické jádro, které je základem magnetických nosičů, je tvořeno magnetickými materiály o průměru menším než 30 nm. Magnetické vlastnosti nosičů jsou určeny výběrem magnetického materiálu, jeho hmotností, koncentrací a distribucí uvnitř polymeru [15].



Obrázek 1: Příklad stavby magnetické nosiče pro biotechnologické aplikace. Upraveno dle [16].

1.1 Vlastnosti magnetických nosičů

V závislosti na praktickém použití je na nano- a mikronosiče nosiče kladena řada požadavků. Mezi základní vlastnosti patří (super)paramagnetismus, morfologické vlastnosti, velikost, tvar, polydispersita, obsah funkčních skupin, dostatečný obsah magnetického materiálu [6]. Nosiče musí být mimo jiné stabilní v roztocích (neagregovat), zachovat si biokompatibilitu, nepodléhat chemickým přeměnám a současně mít vysoký obsah magnetického plniva, aby separace v magnetickém poli byla dostatečně rychlá [17].

Z řady možných tvarů (tyčinka, vlákno, membrána, destička, nepravidelný tvar nosičů) je pro praktické aplikace magnetických nosičů z hlediska hydrodynamických vlastností nejvhodnější kulový tvar. Nosiče s nepravidelným tvarem jsou mnohem náchylnější k mechanickému poškození a rozlomení než je tomu v případě kulových nosičů. Důležitý je nejen pravidelný sférický tvar nosičů, ale také jejich velikost a monodispersita (jednotná velikost). Monodisperzní nosiče vykazují jednotné fyzikální a chemické vlastnosti. Na rozdíl od velkých nosičů, mají nosiče s malým průměrem velký specifický povrch, který slouží k připojení funkčních skupin, případně k imobilizaci biomolekul, jako jsou například enzymy či další biologicky aktivní látky. Vyšší specifický povrch zároveň poskytuje větší výsledný prostor pro možné interakce s cílovými molekulami (účinnost separace je tedy přímo úměrná velikosti povrchu) [17].

1.1.1 Magnetické jádro

Magnetické plnivo musí vykazovat superparamagnetické vlastnosti. Jedná se tedy o materiály, které vykazují magnetické vlastnosti pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Po jeho odstranění své magnetické vlastnosti ztrácejí, přičemž většinou nevykazují zbytkový magnetismus a tudíž nedochází k jejich nežádoucí agregaci. Tyto požadavky dobře splňují některé oxidy železa, zejména magnetit Fe_3O_4 ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$) a maghemit $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ [6]. Magnetit Fe_3O_4 je černý feromagnetický oxid obsahující ve své mřížce ionty Fe^{2+} a Fe^{3+} , které se projevují velmi silnou magnetizací. Stejnou strukturu mřížky má také maghemit, který obsahuje pouze ionty Fe^{3+} . Vhodné magnetické vlastnosti vykazují také sloučeniny kobaltu, chromu, niklu či manganu, ale vzhledem k jejich toxicitě je jejich použití omezené a biomedicinské využití vyloučeno [17].

Z hlediska velikosti magnetických nosičů je upřednostňována velikost v rozsahu mikrometrů a menší. V případě nanonosičů se velikost pohybuje mezi 10 až 20 nm, jako mikronosiče jsou většinou uváděny nosiče o velikosti od 0,1 μm do 100 μm . Příliš malé nosiče však přestávají být citlivé na působení vnějšího magnetického pole. Platí, že magnetická susceptibilita magnetických mikronosičů musí být co nejvyšší. V praxi to znamená, že musí být nalezen kompromis mezi velikostí aktivního povrchu nosičů a jejich dostatečnou magnetičností. Magnetické vlastnosti materiálů jsou popisovány vzájemným vztahem mezi magnetizací M (magnetická polarizací) a intenzitou magnetického pole H uvnitř materiálu [6].

1.1.2 Povrchová úprava magnetických nosičů

Za účelem vazby biologicky významných látek na povrch magnetických nosičů je třeba jejich povrch modifikovat vhodnými přírodními nebo syntetickými látkami. K tomu se používají zejména přírodní a syntetické polymery, ale je možné využít i některé organické sloučeniny nebo anorganické materiály. Funkcionalizované magnetické nosiče musí splňovat řadu specifických kritérií. Mimo jiné musí být biokompatibilní, zároveň musí být potlačeny vzájemné interakce mezi nosiči a musí být umožněna chemická modifikace nezbytná pro následnou imobilizaci biomolekul. [5] Zejména v případě použití magnetických nosičů pro biologické aplikace je vhodné pokrytí superparamagnetických jader magnetitu Fe_3O_4 ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$) či maghemitu $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ vysoko- nebo nízko- molekulárními polymery, jejichž vrstva minimalizuje nežádoucí a nespecifické interakce kovového jádra s organickými složkami obsaženými v prostředí.

Pro povrchovou úpravu magnetických jader jsou používány, tzv. organické nátěry, povrchově aktivní látky, organické polymery či povlaky tvořené anorganickými látkami jako je oxid křemičitý, uhlík nebo zlato [18]. Magnetické nosiče mohou být pro určité účely pokryty přírodními polymery, jako jsou karboxymethylované polysacharidy, hyalurovaná, pektinová či alginová kyselina [17]. Dalšími polymery, které se jsou používány pro povrchovou úpravu magnetických nosičů, s možností jejich následné funkcionizace, jsou polysacharidy [6], dextran [6], [19], albumin [19], celulóza [19], [20] agarosa [21], alginát, sérový albumin či polymery kyseliny mléčné [13]. Hlavní nevýhodou některých z uvedených přírodních materiálů je nízká mechanická pevnost. Vlastnosti jako je biokompatibilita, biologická degradace na netoxické produkty, inertnost, hydrofobicitu, antimikrobní vlastnosti, schopnost tvorby gelu a afinitu k proteinům vykazují také chitin [22], [23] a chitosan [24], [25].

Příkladem syntetických organických polymerů používaných pro pokrytí magnetických jader je polystyren (PS), polymethylmethakrylát (PMMA), polyethylenglykol (PEG) [6], polyvinylalkohol (PVA) [6] nebo poly-L-mléčná kyselina (PLA). Pro pokrytí magnetických jader je možné použít také anorganický povlak, nejčastěji je používán oxid křemičitý. Jedná se o amorfni materiál

charakteristický vysokou mechanickou pevností. Dalším vhodným materiálem je zlato, které je velmi stabilní a zároveň umožňuje následnou funkcionalizaci povrchu připravených nosičů přes thiolové skupiny [16].

1.1.2.1 Imobilizace biologicky aktivních látek na magnetických nosičích

Na magnetické nosiče lze s výhodou imobilizovat řadu vysokomolekulárních i nízkomolekulárních biologicky aktivních látek. Vhodně funkcionalizované magnetické mikronosiče či nanonosiče slouží jako nosiče enzymů, protilátek, biologicky významných proteinů a peptidů, oligonukleotidů, nukleových kyselin, hormonů, léčiv, buněk, diagnostických látek, afinitních ligandů a celé řady jiných látek [5].

Mezi základní postupy imobilizace ligandů na nosič patří fyzikální adsorpce (nekovalentní připojení) a chemická (kovalentní) vazba. Metoda fyzikální adsorpce je velmi snadná, rychlá a nedochází během ní k poškození ligandu. Imobilizovaný ligand lze odstranit vymýváním. Ve srovnání s imobilizací kovalentními vazbami je však tato vazba méně spolehlivá a málo stabilní. V některých případech však může být použita pro reverzibilní imobilizaci proteinů [5]. Kovalentní imobilizace je nejčastěji používanou imobilizační technikou. Vyžaduje, aby nosič obsahoval funkční skupiny, např. NH_2 , COOH , OH , SH , nebo CONH_2 . Působením různých činidel se funkční skupiny na povrchu nosiče aktivují pro navázání biomolekul. V případě karboxylových funkčních skupin se používá hydrochlorid 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] karbodiimid (EDC nebo EDAC), který je rozpustný ve vodě, případně N'-dicyklohexylkarbodiimid (DCC) nebo N,N'-diisopropylkarbodiimid (DIC). [5] Zavedení karboxylových skupin na polymerní magnetické nosiče obsahující na svém povrchu hydroxy skupiny je prováděno 2% roztokem KMnO_4 v prostředí 1M kyseliny sírové a kyseliny alkylsulfonové (smáčedlo) [6]. Rozšířenou technikou pro imobilizaci celé řady látek je využití magnetických nosičů s imobilizovaným avidinem [25] nebo streptavidinem [27], které vykazují vysokou afinitu pro biotin.

Významnou skupinou látek, které nacházejí uplatnění v imobilizované formě na magnetických nosičích jsou proteiny, konkrétně enzymy (proteasy – trypsin, chymotrypsin, keratinasa, papain, plasmin, proteasy, urokinasa apod., lipasy, amylolytické enzymy, oxidoreduktasy - lakasa) [5]. Navázáním enzymů na magnetické nosiče mohou získat takto modifikované enzymy výhodnější vlastnosti, např. vyšší stabilitu, rozšířený rozsah optimální teploty, pH apod. Imobilizací se může zvýšit aktivita enzymů a často dochází ke snížení Michaelisovy konstanty K_m (nižší hodnoty K_m ukazují na vyšší afinitu enzymu k substrátu). Imobilizované enzymy je možné používat opakovaně, jsou stálější při skladování a na rozdíl od volných enzymů je možno s nimi lehce manipulovat. [28]

Metoda imunomagnetické separace IMS, kterou lze kombinovat s metodou PCR využívá magnetické nosiče imobilizované protilátkami. Proces kombinující tyto dvě metody (IMS-PCR) je označován také jako MIPA (Magnetic Immuno PCR Assay) [29]. Imobilizované protilátky lze využít pro izolaci a stanovení celé řady antigenů. Velmi významné je využití IMS při separaci buněk patogenních bakterií z potravin a klinických vzorků (zejména *Salmonella*, verotoxigenních kmenů *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*). Pro separaci bakteriálních buněk rodu *Salmonella* byly úspěšně použity magnetické neporézní mikronosiče P(HEMA-co-GMA) a P(HEMA-co-EDMA) s navázanými polyklonálními protilátkami pro rod *Salmonella* pomocí trichlortriazinové metody [11].

1.2 Magnetické polymerní nosiče

Historicky nejčastěji používané polymery k tomuto účelu jsou polystyren (PS) nebo poly(methylmetakrylát) (PMMA). Navzdory jejich širokému využití však tyto polymery vykazují některé nežádoucí vlastnosti. Především se jedná o jejich hydrofobní vlastnosti. Dalším aspektem je jejich obtížná povrchová úprava [6].

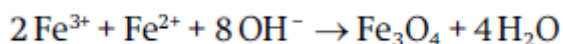
Z výše uvedených důvodů je dáována přednost polymerům na bázi poly(glycidyl methakrylátu) PGMA a poly(2-hydroxyethylmethakrylátu) - P(HEMA). Hydroxyethylmethakrylát (HEMA) vykazuje hydrofilní vlastnosti, je biokompatibilní, inertní, bez náboje a dostatečně měkký. Nosiče tvořené P(HEMA) jsou netoxické, mechanicky stabilní, inertní, nerozpustné ve vodě a vykazují nízkou nespecifickou adsorpci biologicky aktivních látek (proteinů) [14].

Z těchto důvodů jsou polymery na bázi P(HEMA) velmi často používány v různých biolékařských aplikacích [29]. Hydroxylové skupiny na jejich povrchu však nejsou příliš reaktivní. Proto se pro řadu aplikací používají jeho různé kopolymery, např. s glycidylmethakrylátem (2,3 - epoxypropyl-methakrylát (GMA)). Výhodou uvedených polymerních nosičů je obsah oxiranových skupin, které se sice nevyznačují vysokou aktivitou, ale lze je snadno modifikovat hydrolýzou na vicinální dioly [31], amonolýzou, oxidací na karboxylové skupiny [6], [32]. Také jejich povrch lze snadno funkcionalizovat $-\text{SO}_3$, $-\text{N}^+\text{R}_3$, cheláty či streptavidinem [27] a dalšími skupinami [33]. Navíc nosiče na bázi PGMA jsou méně hydrofilní než nosiče na bázi P(HEMA) a jsou velmi dobře rozpustné ve vodě. [34]

1.2.1 Techniky přípravy polymerních nosičů

Pro přípravu polymerních magnetických nosičů byla navržena řada metod. Jednotlivé metody se rozlišují v závislosti na množství magnetického materiálu enkapsulovaného do polymeru, velikosti a polydispersity nosičů [17].

Nejčastěji využívanou metodou k přípravě jader nosičů magnetitu nebo maghemitu ve velkém množství je tzv. “spolusrážení”. Při této metodě reagují železnaté a železité ionty v zásaditých roztocích. Velikost a tvar vzniklých jader (oxidů železa) závisí na typu použité soli, reakční teplotě, pH, iontové síle apod.. Metodou srážení vznikají většinou nosiče s různou velikostí. Přídavek chelatujících organických aniontů (např. kyseliny citronové nebo olejové), nebo polymerů jako je dextran, škrob či poly(vinylalkohol) umožňuje dosáhnout monodisperzity syntetizovaných nanonosičů. [5] Koloidní superparamagnetická jádra magnetických polymerních nosičů testovaných v rámci předkládané dizertační práce byla připravována srážením Fe^{2+} a Fe^{3+} solí ve vodném roztoku amoniaku v přítomnosti poly(etylglykolu) (PEG) nebo jiného stabilizátoru (Rovnice 1) [6].



Rovnice 1: Příprava magnetických jader [6].

Obalení připravených magnetických “jader” polymerní maticí je nejčastěji prováděno heterogenními polymerizačními technikami – suspenzní, emulsní či disperzní polymerizací [6]. Každý systém monomer-magnetické jádro vždy vyžaduje nalezení optimálních podmínek polymerizace. Základním předpokladem je afinita polymerního materiálu k magnetickému plnivu zajištěná jeho modifikací a zavedením funkčních skupin ($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{PO}(\text{OH})_2$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$). [17]. Přítomnost funkčních skupin zároveň umožňuje následné použití pro cílené separace. Výběr těchto funkčních skupin je ovlivněn znalostí použití připravovaných nosičů.

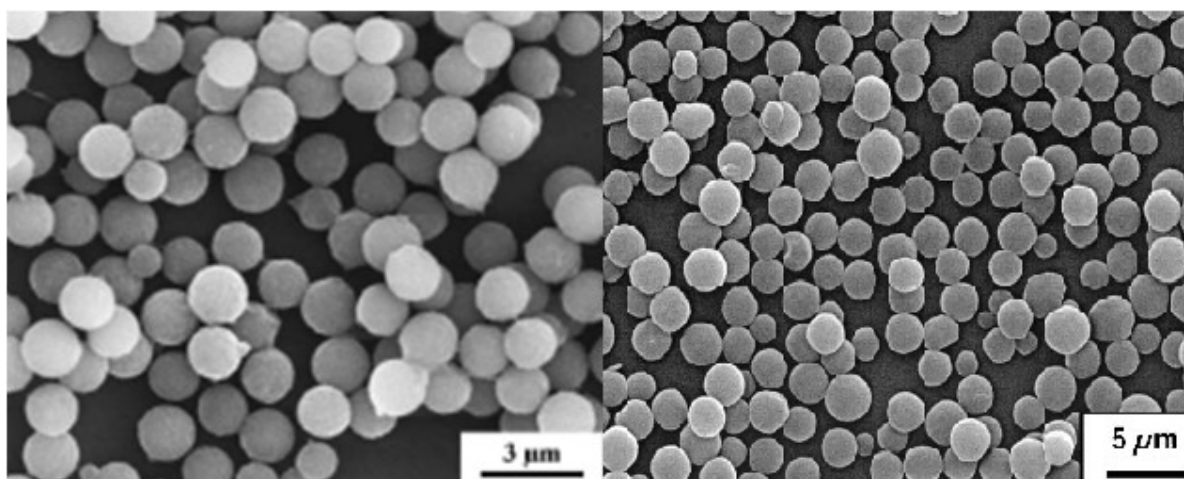
Suspenní polymerizace je nejstarší ze všech heterogenních polymerizačních technik [6]. Je hojně využívanou technikou přípravy nejen polymerních magnetických nosičů. Charakteristická je pro ni širší distribuce připravovaných nosičů, kterou lze regulovat v rozmezí od desítek mikrometrů až do jednotek milimetrů. Právě zmíněná polydispersita však může být při přípravě magnetických nosičů nevýhodou. Tato technika je velmi vhodná pro zapouzdření nejen magnetických nosičů, ale také např. léků. Emulsní polymerizace je podstatně složitější než suspenní technika. Emulsní polymerizace je nejčastěji užívanou metodou pro zapouzdření magnetických jader. [35] Produkt emulsní polymerizace bývá označován jako latex, čímž se většinou rozumí vodná disperze nosičů v rozsahu velikostí několik desítek nanometrů do jednoho mikrometru. Výhodou emulsní polymerizace je vysoká reakční rychlost, vysoká průměrná molární hmotnost produktu a možnost získat monodisperzní nosiče v jednom reakčním kroku. [6], [17]

Výhodou metody disperzní polymerizace je tvorba téměř monodisperzních sférických magnetických mikronosičů v jednom kroku. Vznikající nosiče jsou současně neporézní. V průběhu disperzní polymerizace dochází ke srážení oligomerního řetězce z roztoku monomeru, iniciátoru a stabilizátoru v přítomnosti koloidního magnetitu. [6]

1.2.2 Charakteristika magnetických polymerních nosičů

Magnetické nosiče testované v rámci předkládané dizertační práce při reversibilní adsorpci nukleových kyselin byly připraveny disperzní (ko)polymerizací.

Magnetické nosiče P(HEMA-*co*-EDMA) (poly(hydroxyethylmethakrylát-*co*-ethylendimethakrylát)) (Obrázek 2) byly připraveny kopolymerizací monomerů HEMA a EDMA ve směsi toluen-2-methylpropan-1-ol stabilizované acetát-butyrát celulosy (CAB) [36]. Reakce byla iniciována dibenzoylperoxidem (BPO) v přítomnosti nosičů magnetitu (Fe_3O_4), pokrytých různými sloučeninami, jako jsou například kyselina olejová, polyethylenglykol 6000 a polyvinylpyrolidin PVP K 15 [36], [37].

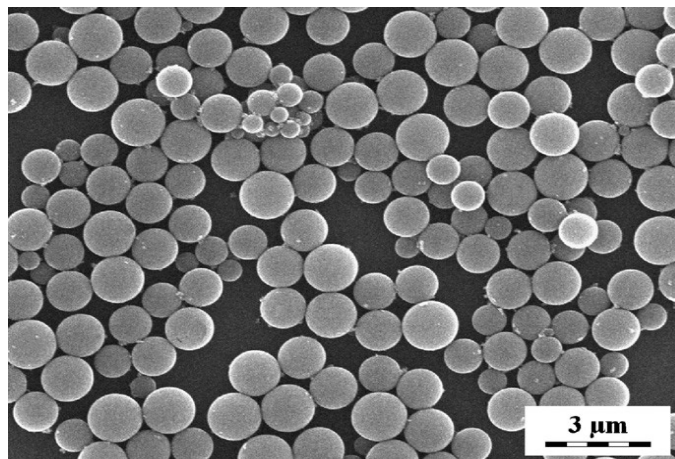


Obrázek 2: Magnetické mikronosiče P(HEMA-*co*-EDMA) (vlevo) a P(HEMA-*co*-GMA) (vpravo), elektronové mikrosnímkové převzaté z práce [36].

Nevýhodou magnetických nosičů P(HEMA-*co*-EDMA) je jejich agregace ve vodném prostředí, v důsledku čehož dochází ke snížení sterické dostupnosti imobilizovaných ligandů. K odstranění tohoto nedostatku byly navrženy P(HEMA-*co*-GMA) - poly(hydroxyethylmethakrylát-*co*-glycidylmethakrylát) mikronosiče (Obrázek 2). Nosiče byly připraveny disperzní kopolymerizací

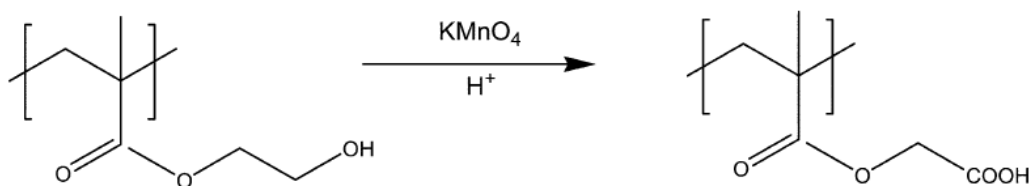
polymerů HEMA a GMA ve shodném prostředí jako u přípravy nosičů P(HEMA-*co*-EDMA) [35], [36].

Dalším typem testovaných nosičů byly magnetické mikronosiče PGMA (Obrázek 3), které byly připraveny disperzní polymerizací GMA v přítomnosti koloidních magnetických nosičů stabilizovaných kyselinou chloristou (HClO_4) nebo hydroxidem tetramethylamonným - $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$ (TMAH). Reakce byla stabilizována polyvinylpyrolidinem a iniciována 2,2'-azobisisobutyronitrilem [12], [36]. Výhodou nosičů PGMA je skutečnost, že nemají ve vodě tendenci aglomerovat. Navíc jejich oxiranové skupiny velmi lehce podléhají hydrolyze, oxidaci za vzniku aldehydů nebo transformaci na aminy či jiné skupiny nezbytné pro imobilizaci cílových biologicky aktivních sloučenin.



Obrázek 3: Magnetické mikronosiče PGMA, elektronový mikrosnímek převzat z práce [12].

Syntetizované polymerní magnetické nosiče P(HEMA-*co*-GMA), P(HEMA-*co*-EDMA) byly funkcionalizovány zavedením karboxylových funkčních skupin oxidací methylen hydroxylových skupin pomocí 2% vodného roztoku manganistanu draselného v kyselém prostředí ($2\text{M H}_2\text{SO}_4$) a přítomnosti alkylbenzensulfonové kyseliny jako smáčedla (Rovnice 2) [36]. Obsah karboxylových skupin na povrchu nosičů byl určen titrací pomocí $0,1\text{ M NaOH}$ na 799 GPT Titrino (Metrohm, Herrisau, Švýcarsko) v prostředí 10% vodného roztoku BaCl_2 [38]. Reversibilní vazba DNA na takto funkcionalizované nosiče předpokladem pro izolaci vysokomolekulární DNA.



Rovnice 2: Zavedení karboxylových funkčních skupin na povrch nosičů P(HEMA-*co*-EDMA) [36].

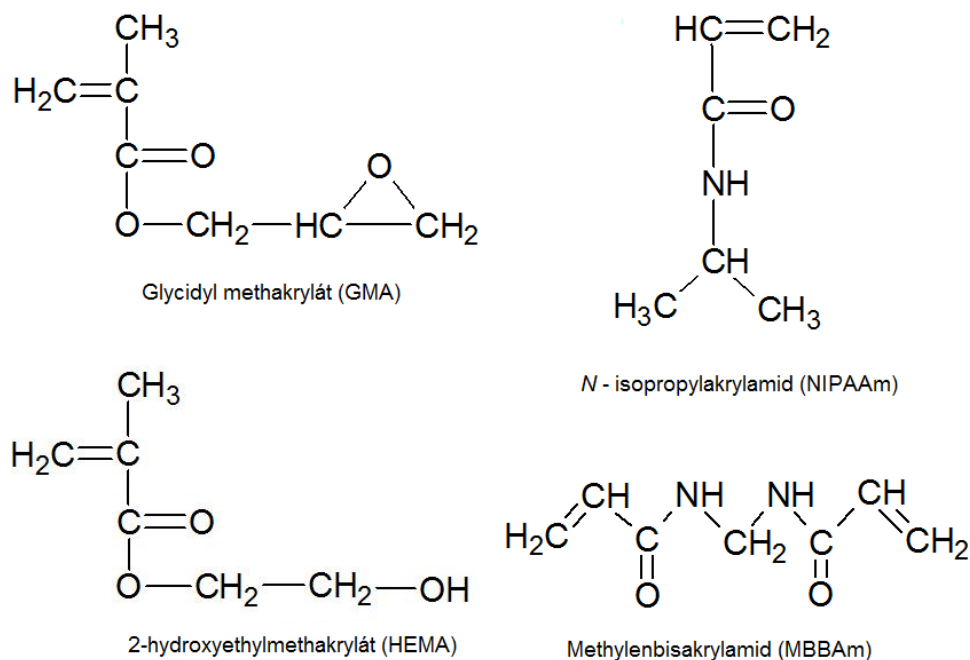
1.3 Monodisperzní termosenzitivní poly (*N*- isopropylakrylamidové) nosiče

Teplotně citlivé látky představují materiály, které mohou být s výhodou využity v řadě biologických aplikací, jako je adheze biologických materiálů. Tyto materiály nachází uplatnění při adsorpci buněk nebo jiných chemických sloučenin na jejich hydrofobní povrch při teplotě vyšší než je přechodová teplota (volume phase transition temperature - VPTT). Při poklesu teploty pod

teplotu fázového přechodu dochází ke spontánnímu oddělení adsorbovaných buněk (molekul) z hydrofilního povrchu [39].

Typickým zástupcem těchto tepelně inteligentních hydrogelů je poly(*N*-isopropylakrylamid) (PNIPAAm). Ve vodném prostředí mohou tyto materiály v závislosti na změně teploty zmenšit svůj objem nebo naopak nabobtnat. Teplota fázového přechodu (VPPT) PNIPAAm 32 °C je velmi blízká teplotě lidského těla (37 °C) [39], a proto jsou hydrogely PNIPAAm testovány pro teplotně kontrolované podávání léků [40], [41] a případné využití v separačních procesech [42]. Při teplotě nad 32 °C dochází ve vodném prostředí ke kolapsu hydrofilních cívek do hydrofobních globulí. To způsobuje zmenšení objemu gelu v důsledku vyloučení absorbované vody. Tento vratný proces umožňuje využití PNIPAAmových hydrogelů pro adsorpci látek při teplotách nad 32 °C (např. proteinů) díky hydrofobním interakcím a jejich následné uvolnění při nízkých teplotách (pod 32 °C). [43] Mikronosiče syntetizované na základě PNIPAAm představují vhodné uspořádání také vzhledem k tomu, že jejich malá a jednotná velikost je výhodná pro dosažení požadovaných fyzikálně – chemických vlastností, v porovnání s konvenčními hydrogely.

Magnetické termosenzitivní polymerní mikronosiče byly syntetizovány z glycidyl methakrylátu (GMA), 2-hydroxyethylmethakrylátu (HEMA), methylenbisakrylamidu (MBAAm) a *N*-isopropylakrylamidu (NIPAAm) (Obrázek 4) a oxidů železa [43].



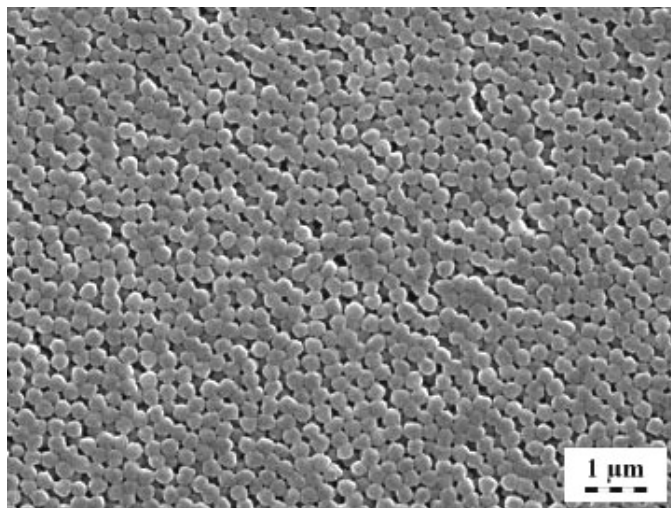
Obrázek 4: Monomery používané při syntéze magnetických termosenzitivních nosičů.

Monodispersní funkcionalizované poly(*N*-isopropylakrylamid-co-glycidylmethakrylá-co-*N,N'*-methylenbisakrylamid) nanonosiče (P(NIPAAm-co-GMA-co-MBAAm)) byly připraveny srážecí polymerizací monomerů (*N*-isopropylakrylamid (NIPAAm), methylenbisakrylamid (MBAAm), glycidyl methakrylátu (GMA)) v jednom kroku ve vodném prostředí probublávaném N₂ za iniciace persíranem amonným ((NH₄)₂S₂O₈). [39]

Magnetické P(NIPAAm-co-MBAAm) nosiče označované v následujícím textu jako NIP 182 (Obrázek 5), které se vyznačují magnetickými vlastnostmi byly získány inverzní emulsní polymerizací monomerů v prostředí 2,2'-azobis(2-methyloctanonitril) (iniciátor reakce), parafinového oleje a koloidních magnetických jader [43]. Primární koloidní superparamagnetická

jádra nanonosičů byla připravena srážením Fe^{2+} a Fe^{3+} solí hydroxidem amonným v prostředí roztoku dextranu, (karboxymethyl)dextranu (CM-dextran), [2-(diethylamino)ethyl]dextranu (DEAE-dextran) a D-manosy (limituje růst nanonosičů ≈ 2 nm) [43].

Oxidace povrchu syntetizovaných (magnetických) termosenzitivních nanonosičů byla provedena zavedením karboxylových funkčních skupin na oxiranové skupiny mikronosičů hydrolýzou pomocí kyseliny chloristé a následnou oxidací hydroxylových skupin manganistanem draselným v kyselém prostředí [43].



Obrázek 5: Snímek mikronosičů P(NIPAAm-co-MBAAm) získaný skenovací elektronovou mikroskopií [43].

Díky svým vlastnostem mohou být PNIPAAmové hydrogely použity pro teplotně kontrolované adsorpce/izolace proteinů [44], peptidů, nukleotidů, DNA, RNA a jiných biomolekul [46]. Výhodou je, že samotný proces separace může být proveden bez větších změn prostředí, tedy za podmínek vhodných pro zachování biokompatibility izolovaných biomolekul v průběhu celého procesu. Významným přínosem je syntéza magnetických PNIPAAmových nosičů, které spojují výhody superparamagnetických a teplotně citlivých polymerních nosičů. Tyto nosiče, mohou být rychle odděleny působením magnetického pole, jejich použitím se snižuje časová náročnost celého procesu separace a zároveň je možné pracovat v malých objemech. [43]

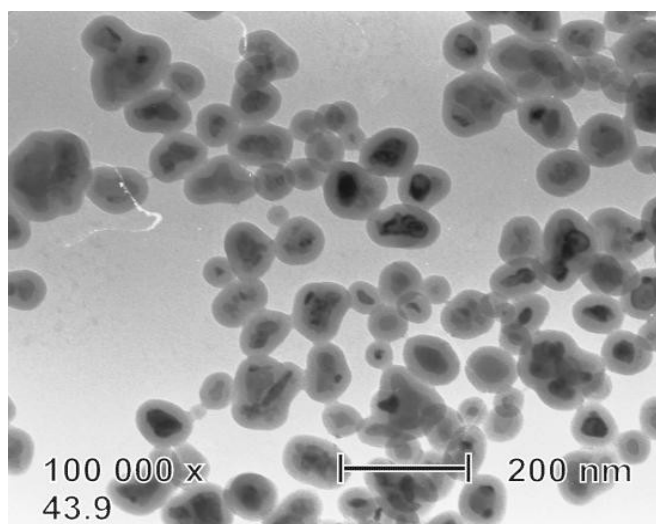
1.4 Magnetické nosiče na bázi silikagelu

Velmi používanou metodou izolace DNA, pro kterou je k dispozici řada komerčně dostupných kitů obsahujících magnetické i nemagnetické nosiče, je vazba DNA na magnetické nosiče pokryté vrstvou silikagelu. V přítomnosti vysokých koncentrací solí nebo chaotropních látek, jako je jodid sodný, guanidin isothiokyanát či guanidin hydrochlorid, je DNA neselektivně adsorbována na povrch nosiče.[47] Následná eluce DNA probíhá v roztoku o nízké iontové síle nebo ve vodě [48]. Roztoky o vysoké iontové síle podporují adsorpci DNA na nosič, přičemž vazba DNA na nosič je dána zvýšením entropie. Vyšší iontovou silou roztoku je redukován negativní potenciál povrchu silikagelových nosičů, v důsledku čehož je snižován elektrostatický odpor mezi negativně nabitou molekulou DNA a povrchem nosičů. Vysoké koncentrace solí zároveň snižují aktivitu vody tvorbou hydratovaných iontů a tím dehydratují DNA a povrch silikagelu [47]. V místě kontaktu molekul DNA s povrchem silikagelových nosičů vznikají intermolekulární vodíkové vazby. [8], [48]

1.4.1 Magnetické nanonosiče manganatého peroskvitu pokryté vrstvou silikagelu

Vedle nosičů na bázi silikagelu se používají pro různé biotechnologické aplikace další anorganické nosiče (magnetické i nemagnetické) jakou jsou: porézní sklo, ferrity (MoFe_2O_3 ; M: Co, Cu, Mn, apod.), magnetit, oxidy titanu a zirkonu, magnetické nosiče pokryté tenkou vrstvou silikagelu a koloidní zlato [49].

Nanonosiče $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ byly připraveny metodou sol-gel, po níž následovalo tepelné a mechanické zpracování. Zapouzdřením magnetických jader, tvořených manganatým peroskvitem (průměrná velikost krystalů 24 nm), rovnoměrným potažením oxidem křemičitým za použití tetraethoxysilanu (TEOS) a následnou frakcionalizací dle velikosti byly získány koloidně stabilní suspenze. Obsah manganu v jádrech výsledné suspenze nosičů byl $0,34 \text{ mg}_{\text{Mn}}/\text{ml}$ ($1,42 \text{ mg}_{\text{LSMO}}/\text{ml}$). Pokrytím magnetických jader vrstvou silikagelu získaly nosiče rozptýlené v suspenzi vysokou stabilitu vlivem Coloumbovských interakcí SiO^- skupin na jejich povrchu.[50] Enkapsulované nosiče $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$ jsou uvedeny na Obrázku 6.



Obrázek 6: Elektronový mikrosnímek nanonosičů manganatého peroskvitu $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$ [51].

Výše uvedené nosiče byly s úspěchem použity pro biolékařské aplikace, především magnetickou fluidní hypertermii či magnetické rezonanční zobrazování (MRI). Vykazují řadu specifických vlastností, jako je relativně vysoká magnetizace urychlující separaci nosičů, slabá zbytková magnetizace, která omezuje tendenci k aglomeraci nosičů po aplikaci vnějšího magnetického pole a nastavitelná hodnota Curieovy teploty (T_c). Adjustace hodnoty T_c zamezuje přehřátí okolních buněk během magneticky indukované hypertemie, neboť tepelný účinek způsobuje poškození buněk již při nízké koncentraci nosičů. [51]

2 SEPARACE NUKLEOVÝCH KYSELIN POMOCÍ DVOUFÁZOVÉHO SYSTÉMU

Separace nukleových kyselin má v molekulární biologii nebývalý význam. Základním požadavkem pro použití technologií pracujících s DNA je její kvalita. Při analýze zejména

reálných komplexních vzorků může v důsledku přítomnosti inhibujících látek docházet ovlivnění výsledků stanovení. Nukleové kyseliny mohou být separovány s použitím magnetických nosičů.

2.1 Struktura a vlastnosti deoxyribonukleové kyseliny

Popsání struktury DNA bylo přelomem v biologii dvacátého století, neboť díky této znalosti byly na molekulární úrovni vyřešeny dva základní problémy: jak je informace specifikující určitý organismus zakódována v chemické struktuře a jak může být informace přesně kopírována a předávána z generace na generaci [52].

Molekula deoxyribonukleové kyseliny (DNA) představuje dlouhý, silně nabitý heteropolymer [53]. Strukturu DNA se podařilo objasnit pomocí rentgenové strukturní analýzy v Cavendishově laboratoři Trinity College Cambridgeské univerzity dvojicí vědců Jamesi Watsonovi a Francisu Crickovi. Výsledky jejich práce byly publikovány v dubnu v roce 1953 ve vědeckém článku *The Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid* v časopise Nature [54].

Model DNA navržený Crieckem a Watsonem je složen ze dvou polynukleotidových řetězců, které jsou v dvoušroubovici navzájem spojeny vodíkovými můstky mezi bázemi. Průměr DNA dvoušroubovice je 2 nm, přičemž délka natažené molekuly může dosáhnout až několika centimetrů v závislosti na typu organismu [54]. Báze se nachází uvnitř dvoušroubovice s cukr-fosfátovou kostrou vně. Fosfátové zbytky udělují DNA negativní náboj. [54] Molekula DNA nese průměrně jeden elementární záporný náboj na každých 0,17 nm délky dvoušroubovice [52]. Báze se nepárují náhodně, adenin se váže s thyminem a guanin s cytosinem. V obou případech se větší bicyklická báze (purin) páruje s monocyklickou (pyrimidin). Toto komplementární párování bází umožňuje párům bází zaujmout energeticky nejvýhodnější konformaci v rámci dvoušroubovice. V tomto uspořádání mají oba páry bází podobnou šířku, která zajišťuje stabilní vzdálenost cukr-fosfátové kostry obou řetězců podél celé délky molekuly DNA [52].

Způsob jakým jsou nukleotidy spojeny, dává řetězci DNA polaritu. Díky této polaritě řetězce DNA je konvenčně jeden konec označován jako 3' (končí – OH skupinou sacharidu) a druhý jako 5' (končí fosfátovou skupinou). Obě báze se spolubmohou párovat ve dvoušroubovici jen v případě, že jsou oba řetězce vůči sobě antiparalelní, polarita jednoho řetězce je opačná k polaritě druhého. První řetězec DNA molekuly obsahuje sekvenci nukleotidů, která je přesně komplementární k nukleotidové sekvenci druhého, partnerského řetězce [56].

Struktura DNA je v závislosti na uspořádání dělena na tři úrovně: primární, sekundární a terciální. Primární strukturou DNA se rozumí seřazení deoxyribonukleotidů v polydeoxyribonukleotidových řetězcích. Sekundární strukturu představuje výše uvedené stočení polydeoxyribonukleotidových řetězců do dvoušroubovice. Molekulu dsDNA (*double stranded* DNA) tvoří dvě nukleotidová nanovlákná, která jsou obtočena jedno kolem druhého v útvaru o průměru 2 nm. Jedna otočka dvoušroubovice je asi 3,5 nm nebo 10-10,5 bází dlouhá [57].

V závislosti na nukleotidové sekvenci, obsahu vody a iontové síle existují tři formy dsDNA, tzv. konformace DNA: A-DNA a B-DNA jsou pravotočivé a levotočivá Z-DNA. B-DNA konformace je základní a charakteristická pro „*in vivo*“ podmínky v prostředí vysoké relativní vlhkosti (95%), kdy je B forma stabilizována molekulami vody na základě vodíkových vazeb. Takto se kolem dvoušroubovice vytvoří vodní obal [54]. Průměr B-DNA konformace je 2,2 nm [117], vyskytuje se u prokaryotických, eukaryotických buněk a také ve virové DNA. Do jaké míry jsou v živých soustavách rozšířeny ostatní konformace DNA, není zatím známo [54]. Po částečné dehydrataci, při relativní vlhkosti prostředí kolem 75 % předchází B forma na A formu. A forma je 11-12 bází dlouhá [57] a je přítomna např. ve sporách bacilů [54]. Z konformace byla poprvé

pozorována u syntetického oligomeru. Terciární struktura DNA je prostorovým uspořádání sekundární struktury DNA. Tato forma struktury je označována jako nadšroubovice (superhelix) a vyskytuje se u prokaryotních a eukaryotních buněk [52].

Fosfátové ionty nesou v molekule DNA negativní náboj. Negativní náboj vytváří elektrostatickou odpudivou sílu v obou vláknech a pro její neutralizaci je zapotřebí přítomnost kladných iontů v okolí dvoušroubovice. Je-li molekula v elektrickém poli, vzniká tzv. drift, který se využívá při aplikacích elektroforézy.

Intenzivní výzkum v oblasti přírodních látek, zejména v biochemických aplikacích v současné době vyžaduje mimo dokonalé separace čisté látky ze složité směsi, také zachování její biologické aktivity. K dalším cílům patří snížení nákladnosti separace, zvýšení výtěžnosti či snížení tvorby artefaktů jako jsou oligomery, agregáty s jinými bílkovinami. Charakteristickými vlastnostmi, které se využívají při izolaci biologicky aktivních látek, jsou rozpustnost, disociace, molekulová hmotnost, adsorpční vlastnosti a vazebná afinita k jiným molekulám [57].

2.1.1 Kondenzace DNA

Nukleové kyseliny mohou existovat ve formě hydratované šroubovice nebo v kompaktní globulární (kulovitě-spirálovitý stav). Přechod mezi těmito dvěma formami DNA je možný v důsledku kondenzace molekuly DNA. [52]

„*In vivo*“ je DNA přítomna právě v této vysoce kompaktní, tzv. kondenzované formě. Délka dsDNA je za fyziologických podmínek v závislosti na sekvenci DNA asi 50 nm. Tato hodnota je však poměrně malá ve srovnání s délkou „rozbalené“ DNA. Jedním z hlavních důvodů je, že prostor, který má DNA k dispozici za podmínek „*in vivo*“ je mnohem menší než ten, který obsadí v případě volné difúze v roztoku. Schopnost „sbalení“ sama sebe s pomocí iontů a dalších molekul za účelem vyrovnání se s omezeným prostorem je velmi pozoruhodná [53].

Kondenzace a dekonenzace DNA jsou dva protichůdné procesy, umožňující remodelaci molekuly DNA do kompaktnějšího či naopak volnějšího uspořádání. Kondenzace DNA je obvykle definována jako „kolaps“ rozvinutého DNA řetězce do jedné nebo několika kompaktních molekul obsahujících uspořádané nosiče [54]. Kondenzace se děje na několika úrovních a je regulována, jelikož má významný vliv na genovou expresi. Zjednodušeně platí, že kondenzované oblasti jsou tzv. transkripčně umlčené, jinak řečeno geny v nich ležící se při expresi nepřepisují. Silně a trvale kondenzovanými oblastmi jsou regiony bez genů, tzv. heterochromatin, naopak v euchromatinu je míra kondenzace zpravidla nižší. [52]

„*In vitro*“ lze kondenzaci DNA vyvolat působením vnější síly, v jejímž důsledku dojde ke „stlačení“ dvoušroubovice nebo vyvolání vzájemných přitažlivých interakcí mezi DNA segmenty. Prvně jmenovaný efekt lze dosáhnout například pomocí osmotického tlaku, vyvolaného působením neutrálního polymeru a monovalentní soli za vzniku kompaktní Ψ -DNA, kdy symbol Ψ označuje působení polymeru a soli. Síly, které způsobují stlačení dvoušroubovice vycházejí z entropie kolize DNA s polymery, které DNA obklopují. Sůl způsobuje neutralizaci náboje DNA vedoucího ke snížení DNA-DNA odporu. Typickými zástupci biologicky kompatibilních kondenzačních činidel jsou neutrální polymery jako je polyethylenglykol (PEG) v přítomnosti Na^+ nebo vícemocných ligandů. Ve vodných roztocích vyžaduje kondenzace DNA obvykle ligandy s náboje 3^+ nebo vyšším. Monovalentní Na^+ tedy nemůže sám o sobě vést ke kondenzaci DNA, pokud není zajištěno zvýšení osmotického tlaku přítomností neutrálních polymerů, např. zmíněného PEG. [53]

Nad kritickou koncentrací zmíněných kondenzačních činidel dochází ke kondenzaci dvoušroubovice DNA molekuly z náhodného cívek do složitějších kompaktních struktur (kulovitě-

spirálovitého stavu). Morfologie vzniklého kondenzátu je závislá na vlastnostech roztoku a struktuře kondenzačních činidel [59]. Kondenzace dvoušroubovice DNA se vyznačuje ostrým fázovým přechodem, který se odehrává v úzkém intervalu koncentrací kondenzačních činidel. Termodynamická podstata přechodu do kulovitě spirálovitého stavu vychází z klasické teorie polymerů, která také byla později na mechanismus kondenzace DNA uplatněna. Kondenzace molekuly DNA je ovlivňována fyzikálními vlastnostmi molekuly DNA, které vycházejí z její stavby. Jedná se především o hydratační síly, rozložení náboje v molekule DNA či DNA-DNA interakce. [53]

2.1.2 Denaturace a renaturace DNA

Při zvýšené teplotě (případně působením chemických činidel (alkalická denaturace)) dochází k denaturaci dsDNA neboli přerušení vodíkových vazeb poutajících komplementární DNA řetězce za vzniku jednořetězcových molekul DNA (ssDNA – single strand DNA). Teplota, při které dochází k denaturaci dsDNA závisí na obsahu guaninu a cytosinu v DNA. Čím více obsahuje GC-párů, tím vyšší teploty je zapotřebí k její denaturaci. Rozmezí denaturačních teplot se pohybuje mezi 30° – 100°C. Teplota, při které zdenaturovalo 50% molekul dsDNA je označována jako teplota tání – T_m. [52] T_m je lineárně závislá na procentuálním obsahu guaninu a cytosinu dsDNA, což vychází z výše uvedené skutečnosti, že čím více párů GC je v DNA struktuře obsaženo, tím vyšší teplota je zapotřebí k její denaturaci.

Teplota tání je definována ve formě Rovnice 3, kde GC představuje molární podíl guaninu a cytosinu v DNA, 0,41 = empiricky stanovený koeficient pro poly(AT) T_m = 69,3. Rozpadem dsDNA na ssDNA, které absorbují UV-záření silněji, než molekuly dvouřetězcové dochází k tzv. hyperchromnímu efektu, kdy dochází ke zvýšení absorpance ultrafialového spektra [52].

$$T_m = 69,3 + 0,41 (GC)$$

Rovnice 3: Výpočet teploty tání (T_m) DNA [40].

Zpětné obnovení struktury původní dvoušroubovice z řetězců ssDNA uvolněných denaturací je označován pojmem renaturace. Renaturace je dosaženo pozvolným snižováním teploty roztoku obsahující denaturovanou ssDNA. Proces renaturace směsi dsDNA z různých zdrojů, kdy dochází ke spojování částečně nebo úplně komplementárních řetězců za vzniku hybridních molekul je označován jako hybridizace molekul DNA. Pravděpodobnost tvorby hybridních molekul je tím vyšší, čím více se shodují hybridizované molekuly v sekvenci nukleotidů [52].

2.2 Dvofázové vodné systémy

Nejběžnější, nejlépe propracovanou a nejdéle známou separační metodou je extrakce neboli rozdělování látek mezi dvě nemísitelné fáze, využívající organická rozpouštědla. Princip extrakce je primárně založen na chemických vlastnostech jednotlivých komponent, jako je hydrofobicita a hydrofilita jednotlivých látek a jejich vzájemných interakcích [60]. Nevýhodou extrakce biomakromolekul je jejich nerozpustnost a nízká stabilita v běžně používaných organických rozpouštědlech, proto je nelze pomocí těchto činidel extrahovat [58].

Dvofázový vodní systém je založen na rozdělování látek mezi organickou a vodnou fází. Je používán především při izolaci biomolekul, které je nutné izolovat v aktivní a nedenaturované formě. Systémy, které jsou vhodné pro extrakci biomakromolekul, je možné připravit přidáním dvou hydrofilních polymerů do vodného roztoku, nebo přidáním jednoho polymeru do vodného

roztoku vhodné soli (NaCl). Při vhodné koncentraci dochází k vytvoření dvou nemísitelných fází, v nichž voda je základní složkou, díky čemuž je toto prostředí příznivé pro biologicky aktivní makromolekuly či buněčné orgány [58]. Jednotlivé fáze se tvoří při limitující koncentraci polymerů, která závisí na jejich charakteru, pH, teplotě roztoku, iontové síle intramolekulárních vazeb a molekulární hmotnosti jednotlivých polymerů. Obě fáze obsahují ze 70-90% vody. Nemísitelnost jednotlivých fází je přisuzována zejména rozdílu hustoty vodných roztoků v jednotlivých fázích.

Nejčastěji používaným hydrofilním polymerem je polyethylenglykol (PEG) o různé molekulové hmotnosti, druhým polymerem bývá dextran. PEG je polymerní látka s dlouhými řetězci, jeho základní monomerní jednotkou je etylenglykol, který je tvořen jednoduchou strukturou se vzorcem C_2H_4O . Je rozpustný v mnoha organických rozpouštědlech (např. v dichlormetanu nebo tetrahydrofuranu) a rovněž ve vodných roztocích. Hydrofilní charakter PEG je využíván ve fyziologických systémech. Je-li přítomen na povrchu, snižuje adsorpci proteinů a adhezi buněk. PEG má mnoho strukturních, chemických a fyzikálních vlastností blízkých extracelulární matrix v buňce. Je používán jako biointeraktivní nanohydrogel. PEG je netoxický a biokompatibilní, díky čemuž je využíván v biomedicínských aplikacích jak „*in vivo*“, tak „*in vitro*“, v cílené dopravě léčiv do organismu či tkáňovém inženýrství. [57]

Látky obsahující jak polární, tak i nepolární skupiny (např. proteiny), se mohou podle podmínek extrahovat jak do horní PEG fáze, tak i do výrazně hydrofilní dolní fáze, zatímco hydrofilní sloučeniny, např. nukleové kyseliny, přecházejí do dolní fáze [58].

2.3 Adsorpce DNA na povrch nosičů a její eluce

Mechanismus selektivní vazby DNA na magnetické nosiče a její následná eluce a uvolnění z těchto nosičů do elučního pufru byl značně studován [62]. Bylo prokázáno, že adsorpce DNA na povrch (ne)magnetických nosičů je podmíněna kondenzací DNA, v důsledku které se DNA dostává do kulovitě-spirálovitého stavu. Pro navození tohoto stavu, je nutná přítomnost polyethylenglykolu (PEG) a chloridu sodného [64] - [67].

PEG je polymerní látka s dlouhými řetězci, která v přítomnosti chloridu sodného způsobuje dehydrataci molekul DNA a tím způsobuje srážení makromolekul [35]. Při nízké koncentraci soli, je DNA makromolekula přítomna ve formě náhodných cívek. Nad kritickou koncentrací PEG a při vysoké koncentraci solí dochází ke kondenzaci do kompaktního a relativně hustého stavu.

Kondenzace makromolekul DNA ve vodném roztoku PEG nad jeho kritickou koncentrací byla studována v řadě vědeckých prací [63]-[67]. V řadě publikací byla věnována pozornost vzájemné souvislosti kritické koncentrace a stupně polymerace použitého PEG a koncentrace chloridu sodného nutného pro dosažení kondenzace DNA. Bylo zjištěno, že kritická koncentrace PEG klesá se stupněm polymerace PEG a s koncentrací soli [64]. Bylo také prokázáno, že PEG se na povrch oxidu křemičitého (pokrytého silanolovými skupinami) adsorbuje prostřednictvím vodíkových vazeb [66]. Proto lze předpokládat, že molekuly DNA ve složeném (kondenzovaném) stavu interagují s modifikovaným povrchem hydrofilních nosičů (pokrytých hydroxylovými nebo karboxylovými skupinami). Mechanismus reverzibilní adsorpce kondenzované DNA na povrch polymerních nosičů, nesoucích na svém povrchu záporně nabitě funkční skupiny (např. karboxylové funkční skupiny) je komplexní povahy a dosud nebyl plně objasněn [63], [68].

3 AMPLIFIKACE DNA

3.1 Molekulárně diagnostické metody

Molekulárně diagnostické metody splňují vysoké nároky, které jsou kladeny na metody používané pro průkaz mikroorganismů, jako je vysoká specifita, citlivost, jednoduchost a robustnost. Mezi nové trendy patří vývoj postupů, které jsou založeny na využití známých principů, jako je interakce antigen-protilátka, hybridizace NK a PCR metody v kombinaci s uplatněním imobilizovaných systémů s využitím magnetických nosičů. Intenzivně jsou studovány a vyvíjeny nové separační techniky především pro práci s komplexními vzorky obsahujícími kontaminanty a inhibitory PCR. V tomto směru nachází v řadě aplikací široké uplatnění magnetické separační procesy využívající pevné polymerní nosiče, které nacházejí uplatnění při

- imunomagnetické separaci bakteriálních buněk
- izolaci protilátek a antigenů
- izolaci nukleových kyselin (DNA, RNA) v molekulární diagnostice
- DNA-DNA hybridizaci
- přenosu léčiv a genů
- a jako biosenzory

Vzhledem k tomu, že dizertační práce je zaměřena na využití pevných nosičů v molekulární diagnostice, bude v následujícím textu věnována hlavní pozornost metodám amplifikace DNA, které byly použity v experimentální práci.

3.1.1 Polymerázová řetězová reakce

Nejvíce používanou molekulárně diagnostickou metodou ve výzkumných a diagnostických laboratořích je polymerázová řetězová reakce (PCR) a postupy na ní založené. Myšlenku amplifikace specifického úseku DNA „*in vitro*“ převedl do praxe jako první v roce 1983 Kary Mullis. Metoda PCR rozšířila možnosti analýzy DNA (klonování genů) a usnadnila molekulárním biologům řadu postupů, které sice bylo možné provádět i v době, kdy bylo známo pouze klonování „*in vivo*“, ale jen s obtížemi [56]. Objev metody polymerázové řetězové reakce předurčil rozvoj nové generace molekulárně diagnostických metod, které umožňují přesnější identifikaci a detekci bakteriálních rodů a druhů [54]. U diagnostických metod došlo k posunu citlivosti „*in vitro*“ do dříve prakticky nedosažitelných hodnot. Pečlivě připravená PCR vede k získání detekovatelného množství DNA, a to i když je počáteční reakci přítomna pouze jedna molekula DNA [55].

Podstatou PCR je cyklicky se opakující syntéza určitého úseku DNA. Princip PCR umožňuje selektivní pomnožení (amplifikaci) vybrané oblasti DNA způsobem podobným „*in vivo*“ DNA replikaci, přičemž velikost amplifikovaného úseku ohraničují dva oligonukleotidy – primery. Syntézu katalyzuje DNA dependentní enzym DNA *Taq* polymerasa izolovaný z *Thermus aquaticus*. [55]

Postupným opakováním tohoto procesu se exponenciálně (2^n ; n = počet cyklů) syntetizuje až 10^9 kopií vybraného úseku DNA. Výsledným produktem PCR jsou amplikony (úseky DNA definované délky o velikosti obvykle desítky až tisíc párů bází (bp)). Jejich přítomnost se v reakční směsi prokazuje v případě konvenční PCR elektroforézou na agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu, případně kvantitativním měřením množství produktu v reálném čase (PCR v reálném čase).

3.1.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Metoda kvantitativní PCR v reálném čase (q-PCR) je moderní molekulárně biologická technika umožňující rychlou, citlivou a spolehlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA nebo RNA. [70] PCR v reálném čase je založena na sledování průběhu polymerázové řetězové reakce amplifikace pomocí fluorescenčních sond či interkalačních barviv, které detekují množství produktu PCR během reakce zvýšením fluorescenční aktivity. Intenzita emitovaného fluorescenčního záření je měřena během každého cyklu PCR a je přímo úměrná množství ampliconu přítomného v reakční směsi.

Výhodou oproti konvenční PCR je možnost přesného stanovení výchozího počtu kopií templátové sekvence DNA, čili schopnost kvantifikace, vysoká citlivost a specifita, rychlost analýzy, možnost automatizace procesu a široké využití (multiplex, allelická diskriminace, high resolution melt (HRM) analýzy) [70].

Způsoby identifikace ampliconů vPCR v reálném čase lze rozdělit do dvou základních skupin. A to na postupy využívající:

- 1) interkalační barviva (SYBR Green 1, LC Green, BEBO, Eva Green, SYTO)
- 2) fluorescenčně značené sondy
 - dvakrát fluorescenčně značené sondy vázající se na střední část amplifikovaného produktu (TaqMan, Molecular Beacons, Q Zyme Assay)
 - jedenkrát fluorescenčně značené sondy (primery) (FRET, LUX)
 - dvakrát fluorescenčně značené primery (Amplifluor, Scorpions)

Nejjednodušší je metoda využívající fluorescenčních barviv, která se interkalují do dvoušroubovice DNA. K nejpoužívanějšímu barvivu patří fluorescenční kyaninové barvivo SYBR Green I (exitace $\lambda_{\max} = 485 \text{ nm}$, emise (vyzáření) $\lambda_{\max} = 524 \text{ nm}$) [70]. Barvivo volně rozptýlené v roztoku směsi PCR emituje minimální záření. K emisi záření dochází, jakmile se SYBR Green začlení do dvoušroubovicové struktury DNA vzniklé po hybridizaci primeru a syntéze komplementárního řetězce na ssDNA. Fluorescence SYBR Green I je po vazbě na dsDNA až 1000x vyšší a fluorescenční signál se zvyšuje se vzrůstajícím množstvím produktu PCR. Signál fluorescence je měřen na konci fáze syntézy nebo kontinuálně. Barviva EVA Green, BEBO či LC Green jsou vhodná pro tzv. high resolution melt analýzu (HRM) umožňující citlivou analýzu bodu tání produktů PCR – identifikace specifity PCR produktu (citlivost 0,01 °C).[70], [71] Hlavní nevýhodou použití fluorescenčních barviv je nemožnost rozlišení nespecifických produktů PCR od specifických. Další nevýhodou, vyplývající z principu fungování těchto barviv, je nemožnost jejich použití u multiplexních reakcí (které umožňuje detekci několika úseků nukleových kyselin v jedné reakci). Naopak velkým pozitivem je jejich finanční dostupnost.

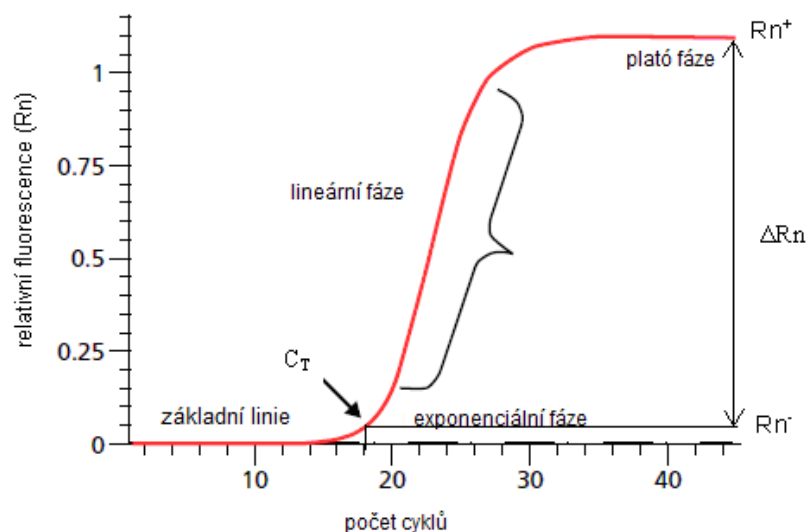
Omezení detekce nespecifických produktů umožňují oligonukleotidové sondy. Jsou založeny na technologii fluorescenční výměny. Příkladem jsou TaqMan sondy, což jsou oligonukleotidy delší než primery s hodnotou T_m vyšší asi o 10 °C, které nesou fluorescenční značku na 5'- konci a zhášec na 3'- konci. Výhodou sond je vysoká specifita, jelikož detekce cílové sekvence probíhá ve 2 stupních - na úrovni vazby primerů a rovněž na úrovni vazby sondy. [70] Nevýhodou je finanční náročnost, komplikovaný návrh sond a optimalizace reakčních podmínek, nelze s jejich pomocí provést analýzu křivek tání.

Vzhledem k tomu, že detekce amplifikačních produktů byla v našich experimentech prováděna pomocí interkalačního barviva SYBR Green a Eva Green, nebude v dalším textu princip metody využívající sond podrobněji popisován.

3.1.2.1 Princip kvantifikace pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase

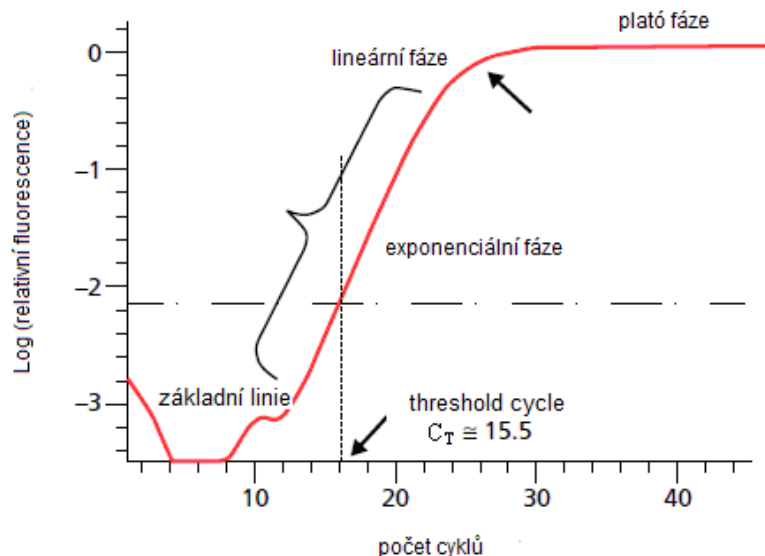
Kvantifikace PCR produktu je prováděna prostřednictvím matematické analýzy amplifikačních křivek vzniklých vynesemím naměřené fluorescence oproti příslušnému cyklu [71] (Obrázek 7). PCR je v závislosti na fluorescenční aktivitě dělena do tří základních fází :

- 1) fáze pozadí (baseline) - nedochází k signifikantnímu vzrůstu fluorescence signálu (produktu PCR)
- 2) exponenciální fáze - exponenciální růst fluorescenčního signálu (množství produktu PCR), trvá asi 4-8 cyklů
- 3) „plató“ fáze - dochází k saturaci systému, množství amplifikovaného produktu se dále nemění a fluorescenční signál zůstává konstantní



Obrázek 7: Standardní křivka amplifikace. Upraveno dle [71].

Používané matematické modely pracují s hodnotou zvanou C_T („threshold cycle“), která se rovná cyklu, kdy amplifikační křivka překročí zmíněný fluorescenční práh (ΔR_n) umístěný do exponenciální fáze reakce. Jinak řečeno, na základě softwarového srovnání hodnot základní linie a trendu R_n je určen bod, ve kterém dochází k signifikantnímu vzrůstu fluorescence (je dosaženo statisticky významné hodnoty fluorescence nad baseline (počáteční stádium reakce)) [71] (Obrázek 8).



Obrázek 8: Semi-log křivka amplifikace. Upraveno dle [71].

Na základě lineárního vztahu mezi logaritmem počátečního množství templátu a C_t hodnoty příslušné amplifikační křivky je založena metoda tzv. absolutní kvantifikace, která je využívána při detekci specifických molekul DNA a přímo stanovuje výchozí počet kopií cílových molekul. Kalibrační křivka (série standardů o známé koncentraci) slouží jako nástroj pro stanovení efektivity reakce, přesnosti, citlivosti a jejího rozsahu. Účinnost reakce (r.e.) je stanovována ze sklonu amplifikačních křivek. V případě 100% účinnosti amplifikace dochází v každém cyklu k dvojnásobnému nárůstu fluorescence a směrnice kalibrační křivky (M) bude mít hodnotu -3,333 (Rovnice 4) [70], [69].

$$\begin{aligned} r.e. &= 10^{(-1/\text{směrnice})} - 1 \\ r.e. &= 100\% = 10^{(-1/-3.33)} - 1 \end{aligned}$$

Rovnice 4: Výpočet účinnosti reakce kvantifikace.

Obecně přijatelná je hodnota směrnice (M) v rozsahu -3,9 až -3,0 což odpovídá účinnosti reakce 80 – 110%. Korelační koeficient (R^2) je měřítkem přesnosti reakce. Projevuje se zde především přesnost pipetování. V případě, že $R^2 \leq 0,985$, tak získané výsledky nelze považovat za spolehlivé [71]. Optimální hodnoty kalibrační křivky charakterizující účinnost kvantifikace souhrnně uvádí Tabulka 1.

Tabulka 1: Parametry charakterizující kalibrační křivku

<i>Parametry charakterizující kalibrační křivku</i>	<i>Optimální hodnoty kalibrační křivky</i>
korelační koeficient – R^2	$\pm 0,99$
směrnice kalibrační křivky - M	-3,9 až -3,0
reakční účinnost – r.e.	80 - 110%

Na základě tzv. relativní kvantifikace, která je založena na relativním srovnávání genové exprese genu zkoumaného s expresí referenčního genu (housekeeping gen) lze porovnávat genovou expresi vzorků. [69], [72] Relativní kvantifikace popisuje změnu exprese zkoumaného

genů v testovaném vzorku ve vztahu ke standardu, kterým může být kontrola, časová řada nebo jiné tkáně, vzorky či geny a populace. Relativní kvantifikace je založena na rozdílné efektivitě reakce.

3.1.3 Metoda restrikční analýzy amplifikované ribosomální DNA

Metoda restrikční analýzy amplifikované ribosomální DNA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)) slouží pro taxonomickou identifikaci bakteriální populace. Je založena na restrikční analýze produktů PCR za předpokladu, že amplikon, kterým může být celý gen nebo část genu pro rRNA, obsahuje cílové místo pro vybraný restrikční enzym.

Restrikční enzymy představují sekvenčně specifické endonukleasy, jejichž působením je štěpena dsDNA na specifických cílových místech uvnitř této molekuly, která jsou tvořena krátkými palindromickými (středově symetrickými) sekvencemi [73]. Rozpoznávací místo enzymu je tvořeno 4 – 8 nukleotidovou sekvencí. Jsou produkovány kmeny většiny bakteriálních druhů a jejich přirozenou funkcí je degradace cizorodé DNA např. při infekci bakteriofága. V případě, že endonukleázy rozpoznávají a štěpí identické sekvence, ale pochází z různých mikroorganismů jsou označovány jako isoschizomery. [74] Jejich označení je odvozeno z počátečního písmene rodového a prvních dvou písmen druhového názvu organismu, z něhož byl enzym izolován [73]. V současné době je známo 3500 restrikčních endonukleas rozpoznávajících 160 sekvencí [74].

Produkt PCR získaný amplifikací je štěpen působením restrikčních enzymů za vzniku sady restrikčních fragmentů (úseky DNA o definované délce), neboli restrikčního profilu, který se liší počtem a umístěním míst pro odpovídající restrikční enzymy v sekvenci DNA. V závislosti na výběru vhodných restrikčních enzymů je možné na základě získaného restrikčního profilu rozlišit mikroorganismy na úrovni druhů. Celkové nebo částečné sekvence 16S rDNA jednotlivých bakteriálních druhů jsou dostupné v online databázi GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Tato databáze je součástí Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI) v USA [74]. Vyhledávání cílových míst lze provádět experimentálně nebo na základě analýzy sekvencí v databázích (např. pomocí programů (algoritmů) TACG nebo ALIGN (<http://workbench.sdsc.edu>) [74].

V rámci publikované práce, byly pro identifikaci vybraných druhů rodu *Bacillus* vybrány restrikční endonukleázy *AluI* a *TagI* [76]. Restrikční endonukleasa *AluI* je produkována organismem *Escherichia coli*, do kterého byl naklonován gen *AluI* z mikroorganismu *Arthrobacter luteus* (ATTC 21606). Rozpoznávací místo (označeno mezerou) je v poloze 5'.... AG CT.... 3' a 3'.... TC GA.... 5'. Enzym *Taq^qI* je restrikční endonukleaza, jejímž zdrojem je bakterie *Escherichia coli*, která nese *Taq^qI* plazmid mikroorganismu *Thermus aquaticus*. Rozpoznávací místo (označeno mezerou) je v místě 5'..... T CGA 3'a 3'.....AGC T 5'. [76]

3.2 Inhibitory PCR a eliminace jejich vlivu

Nejčastějším problémem spojeným s PCR je možnost kontaminace vzorku. Při analýze čistých bakteriálních kultur je použití PCR zpravidla bezproblémové. Problémy mohou nastat při identifikaci cílových mikroorganismů v reálných komplexních vzorcích nebo u terénních kmenů.

V důsledku vysoké citlivosti PCR představují jeden z negativních vlivů falešně pozitivní výsledky, které jsou důsledkem kontaminace exogenní DNA. Eliminace tohoto vlivu je možné použitím dekontaminačních procedur a dodržováním pracovních opatření zamezujících kontaminaci [1], [2].

Druhým problémem mohou být falešně negativní výsledky amplifikace [1], ke kterým dochází v důsledku působení inhibitorů PCR. Zejména vzorky komplexní povahy jako jsou izoláty z klinického materiálu či potravin mohou interferovat v PCR v důsledku přítomnosti inhibitorů. Inhibitory mohou být přítomny jednak v samotném vzorku (krev, tkaniny, tkáň, půda) a dále mohou být do vzorku zaneseny v průběhu jeho zpracování, např. při extrakci DNA. V závislosti na původu jsou inhibitory děleny na extracelulární a intracelulární. Extracelulární inhibitory jsou obecně původu exogenního nebo endogenního. Endogenní inhibitory zahrnují kontaminanty komponent PCR, chemická činidla používaná při zpracování a purifikaci vzorků, jako je fenol, dodecylsulfát sodný (SDS), isopropanol, ethanol, přebytek solí (KCl, NaCl), necílová DNA či enzymy. Všechny tyto látky přispívají prostřednictvím různých inhibičních mechanismů ke snížení účinnosti PCR [77]. Jako endogenní inhibitory mohou vystupovat také přirozené reagenty vzorků, např. krev, heparin, močovina, antibiotika, ionty Ca^{2+} v mléce a mléčných výrobcích, tuky, glykogen, těžké kovy a řada dalších. Původ exogenních inhibitorů je velmi různorodý a jejich přítomnost ve vzorku může být způsobena nedostatečně sterilní a pečlivou prací v laboratoři (prach, pyl, pudr z gumových rukavic apod.) [1]. Intracelulární inhibitory jsou součástí buněk detekovaných mikroorganismů a mohou se proto uvolnit spolu s DNA [1]. Řadíme mezi ně například endogenní nukleasy, peptidy a proteiny.

V důsledku přítomnosti extracelulárních [1] nebo intracelulárních [11] inhibitorů může docházet ke vzniku falešně negativních výsledků nebo snížení citlivosti reakce [69]. Inhibitory PCR obvykle reakci ovlivňují prostřednictvím interakce přímo s nukleovou kyselinou či primery, kdy způsobují jejich degradaci (jedná se o nukleasy). DNA polymerasa může být rovněž degradována proteinasami, denaturována fenolem nebo detergenty, či případně může být inhibováno její aktivní místo. Některé inhibitory mohou také snižovat dostupnost kofaktorů - např. iontů Mg^{2+} , které katalyzují působení *Taq* polymerasy. Takto působí např. ionty Ca^{2+} , které jsou obsaženy v mléce a mléčných výrobcích [69], [78]. Purifikace templátové DNA může být také ovlivňována přímou vazbou inhibitorů na dsDNA, případně ssDNA.

Falešně pozitivní výsledky mohou být zapříčiněny také v důsledku vysoké citlivosti PCR metody, zdrojem kontaminace tak může být i poměrně velké množství cílových molekul DNA nebo RNA přítomných ve vyšetřovaných vzorcích.

Jak vyplývá z výše uvedených skutečností eliminace vlivu inhibitorů má zásadní význam pro průběh polymerázové řetězové reakce. Základním předpokladem pro zamezení či snížení kontaminace vzorků exogenními inhibitory je dodržení podmínek aseptické práce, dekontaminace povrchu použitého materiálu pomocí UV záření (254 nm), případně použití PCR boxů s laminárním prouděním [1], [69]. Jednou z nejjednodušších možností snížení či odstranění účinku inhibitorů je důkladné promytí vzorku či samotných buněk či zředění vzorku. Mezi běžně užívané konvenční purifikační metody vedoucí k odstranění inhibitorů patří také úprava DNA pomocí vodných dvoufázových systémů, gelové filtrace, gradientové centrifugace, (ultra)filtrace, imunologická separace, pováření vzorků, dialýza či extrakční metody. Tyto metody se však často vyznačují časovou i finanční náročností, nehledě na nutnost použití chemikálií (fenol/chloroform), které sami mohou působit v PCR inhibičně.

Alternativním moderním způsobem, jak přímo odstranit vliv inhibitorů a poměrně rychle izolovat čistou DNA v kvalitě vhodné pro PCR je použití vhodně funkcionalizovaných magnetických nebo nemagnetických nosičů, které specificky interagují s cílovou DNA. Tato technika, která je označována jako reversibilní imobilizace na pevné fázi (SPRI) [7], [9], [13] využívá pevnou fázi pro selektivní adsorpci DNA v přítomnosti ostatních složek biologického

materiálu, jako jsou proteiny, lipidy, sacharidy nebo RNA. Oproti konvenčním metodám separace DNA skýtá metoda SPRI několik výhod, především rychlost, jednoduchost provedení, citlivost, spolehlivost a bezpečnost. Izolovaná DNA se vyznačuje také vysokou čistotou a výtěžkem dostatečným pro provedení detekce molekulárně diagnostickými metodami. Velkým přínosem je zejména to, že není nutné žádné speciální laboratorní zařízení.

Pro izolaci cílových bakteriálních buněk z komplexního vzorku (potravina, kultivační medium) je možné použít metodu imunomagnetické separace (IMS). Základem této techniky je modifikace povrchu magnetických nosičů navázáním protilátky, na kterou se specificky vážou pouze požadované složky biologického materiálu. Technika IMS našla významné uplatnění především při izolaci mikrobiálních buněk [7].

3.3 Metoda rozlišení živých a mrtvých buněk

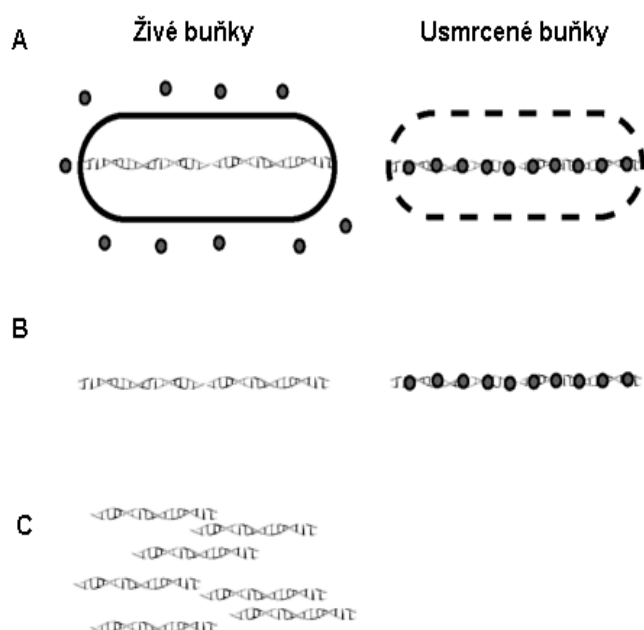
Použití molekulárně diagnostických metod identifikace a kvantifikace mikroorganismů založených na detekci DNA jako je PCR a qPCR je omezeno neschopností rozlišovat mezi DNA pocházející z živých a odumřelých bakteriálních buněk. DNA nebo rRNA může být ve vzorcích detekována několik hodin nebo i dnů po usmrcení buněk [75].

Řada studií prokázala, že životaschopnost bakteriálních buněk není pouze otázkou určení, zda je buňka mrtvá nebo živá [79]-[84]. Bakteriální buňky mohou být živé, ale tzv. nekultivovatelné (active but non-culturable (ABNC) [85]). V tomto stavu buňky nerostou na kultivačních médiích, ale přesto zůstávají zachovány neporušené a vyznačují se životaschopností, případně i infekčností. Rovněž v důsledku přítomnosti subletálně poškozených buněk, které ztratily schopnost tvořit kolonie, může dojít k podhodnocení počtu buněk.

Základní postupy umožňující rozlišení živých a mrtvých buněk jsou založené na membránové integritě buněk, metabolické aktivitě a analýze nukleových kyselin [86]. S úspěchem byly použity metody využívající interakce fluorescenčních barviv (ethidium bromid, propidium jodid a ethidium homodimer 1, SYTOX Green [87]) s DNA.

DNA, která slouží jako matrice pro PCR je klasickými metodami izolována bez rozdílů z bakteriálních buněk, živých, usmrcených i tzv. nekultivovatelných. Údaje o obsahu živých bakteriálních buněk lze tedy získat až po vyloučení DNA pocházející z mrtvých buněk z celkové analýzy [88].

PCR v kombinaci s ethidium monoazidem (EMA) je selektivní metoda, která umožňuje rozlišit živé a mrtvé buňky [89]. Rozšiřuje možnost využití metody PCR v potravinářství např. pro stanovení počtu živých a mrtvých buněk probiotických bakterií v mléčných výrobcích. Metoda je založena na poznatku, že EMA může vstoupit do cytoplasmy usmrcených buněk v důsledku nefunkčnosti (porušení) buněčné stěny mrtvých buněk. Fotoaktivací se EMA (halogenová lampa 650 W) kovalentně váže na DNA, která se z tohoto důvodu neamplifikuje v PCR (Obrázek 9). V PCR se amplifikuje jen DNA živých buněk, které jsou proti průniku EMA chráněny neporušenou buněčnou stěnou [90].



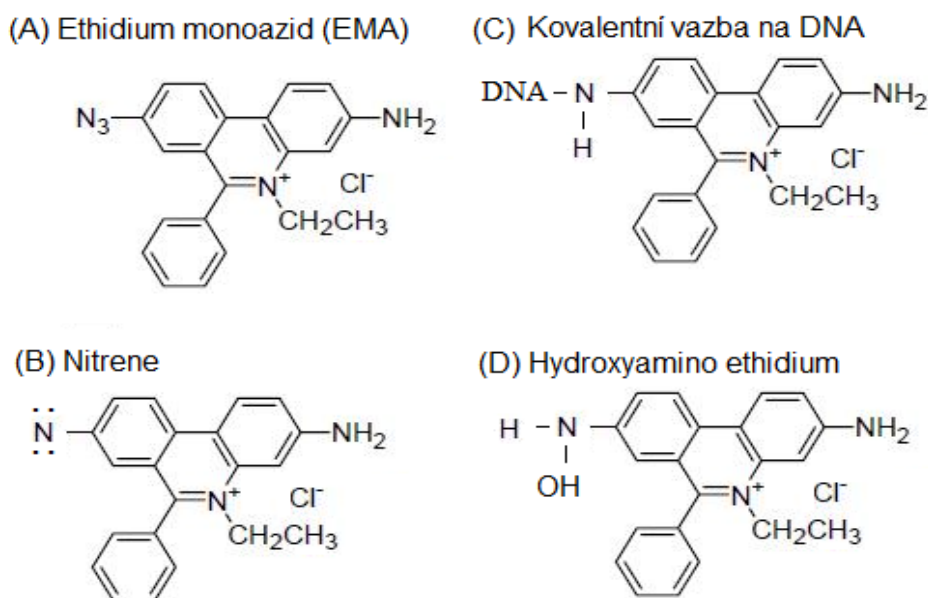
(A) EMA je přidán k živým i usmrčeným buňkám. EMA penetruje porušenou buněčnou stěnou usmrčených buněk a váže se na DNA. V důsledku ozáření dochází k tvorbě kovalentní vazby s DNA. EMA neproniká do živých buněk.

(B) Po purifikaci a lyzi buněk rozlišujeme dva typy DNA. DNA živých buněk není nijak změněna. Naproti tomu na DNA buněk usmrčených je kovalentně vázána na EMA.

(C) DNA živých buněk je v průběhu PCR amplifikována. U DNA usmrčených buněk amplifikace neproběhne, v důsledku kroslinek DNA způsobených vazbou EMA.

Obrázek 9: Schematické znázornění EMA-PCR (upraveno dle [91]).

Ethidium monoazid (3-amino-8-azido-5-ethyl-6-fenyl-fenantridinium chlorid, EMA) je interkalační barvivo obsahující azidovou skupinou (Obrázek 10).



(A) Ethidium monoazid (3-amino-8-azido-5-ethyl-6-fenyl-fenantridiniových chlorid)

(B) Změna azidové skupiny vázané v EMA na nitrenovou skupinu po fotoaktivaci.

(C) Vazba EMA (po fotoaktivaci) na DNA kovalentní vazbou pomocí nitrenové skupiny.

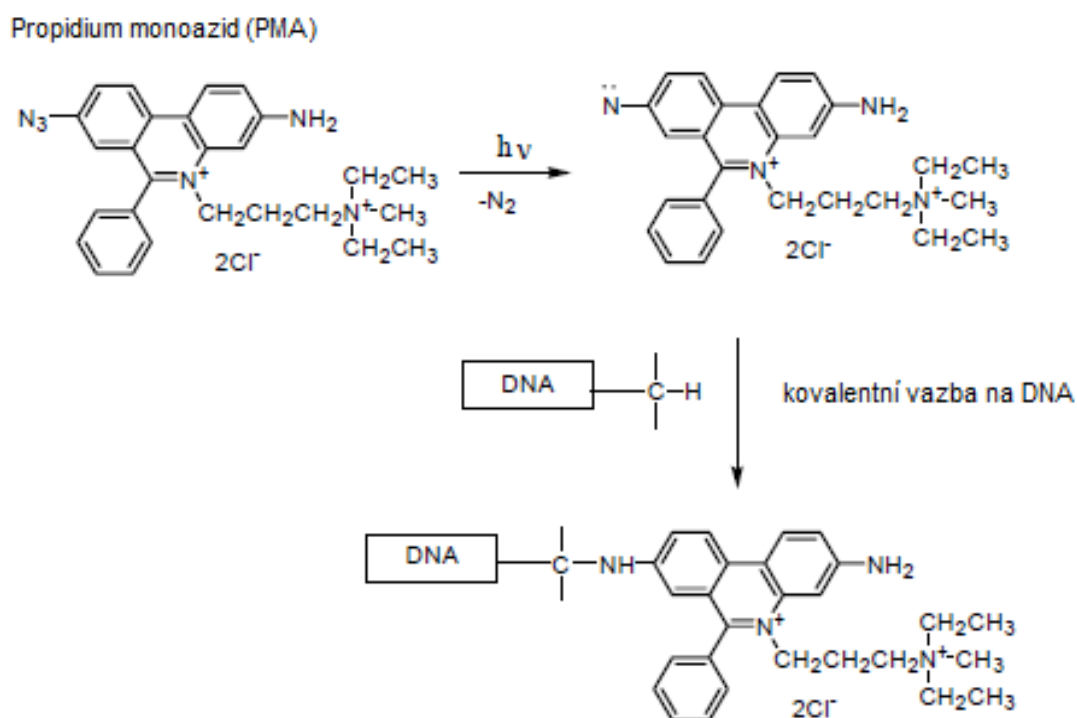
(D) Hydroxyamino ethidium (HA)

Obrázek 10: Schéma transformace EMA a vazby EMA na DNA po fotoaktivaci (upraveno dle [92])

Ačkoli je vazba EMA na DNA je reversibilní, po fotoaktivaci dochází k ireversibilní kovalentní vazbě EMA na DNA (absorpční maximum 460 nm). Vazba EMA na DNA inhibuje amplifikaci DNA v průběhu PCR [93]. Nenávaný EMA reaguje s molekulami vody za vzniku hydroxylamino ethidia (HA), který se vyznačuje nízkou schopností kovalentní vazby na DNA [82], [92], [94].

V porovnání s běžně užívanými metodami pro určení životaschopnosti bakteriálních buněk má metoda EMA-PCR mnohem širší rozsah detekce $\approx 4 \log_{10}$ (poměr živých/mrtvých buněk \log_{10}). Absolutní detekční limit metody EMA-PCR je $\approx 2 \log_{10}$. Mezi výhody metody EMA-PCR patří také její vysoká specifita, flexibilita, časová nenáročnost a možnost jejího použití pro vzorky různého původu, včetně směsných kultur [91]. Mezi nedostatky patří možnost průniku EMA za určitých podmínek i přes membránu živých buněk některých bakteriálních druhů [90] a citlivost k vysokým koncentracím kontaminantů, které pohlcují světelné paprsky. EMA se z těchto důvodů nevyznačuje vysokou citlivostí k životaschopným buňkám [92]. V práci autorů Pana a Breidta [93] bylo prokázáno, že EMA je na rozdíl od PMA, toxický pro živé buňky.

Nevýhody EMA mohou být odstraněny použitím jiného fluorescenčního barviva - propidium monoazidu ((PMA) Obrázek 11), které má stejný mechanismus účinku jako EMA, vyznačuje se však vyšší selektivitou [88]. Při použití EMA může dojít k jeho průniku i do živých buněk některých bakteriálních druhů. Tyto metabolicky aktivní bakteriální buňka s nepoškozenou buněčnou stěnou zajišťují transport EMA z cytoplasmy buněk pomocí membránových čerpadel. EMA, který není dostatečně rychle odstraněn, může být navázan na DNA a vést tak ke značné ztrátě DNA. Vyšší náboj PMA (Obrázek 11) oproti EMA (Obrázek 10) může být důvodem vyšší neprostupnosti nepoškozenou buněčnou membránou a tím zabránění ztrát DNA [88]. Výhodou PMA oproti EMA je, že prostupuje pouze do usmrcených buněk, vyznačuje vyšším nábojem a díky tomu vyšší selektivitou než EMA [90].



Obrázek 11: Princip modifikace nukleových kyselin PMATM (upraveno [95])

Metoda EMA-PCR byla úspěšně použita pro rozlišení živých a mrtvých buněk řady bakteriálních druhů, jako je *Escherichia coli* 0157.H7 [97], *Salmonella typhimurium* [97], *Listeria monocytogenes* [91], [97] a *Campylobacter jejuni* [91]. Jak metoda EMA-PCR, tak i metoda PMA-PCR byla s úspěchem použita pro rozlišení živých a mrtvých buněk řady Gram pozitivních i Gram negativních bakteriálních druhů [90], [94], [97], [98]. Jednou z prvních studií kombinujících působení PMA a metody PCR v reálném čase (qPCR) za účelem specifické detekce a stanovení počtu živých a mrtvých buněk bakterií mléčného kvašení (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* a *Lactobacillus acidophilus*) a *Bifidobacterium lactis* obsažených ve fermentovaných mléčných výrobcích byla publikována v roce 2009 [99].

CÍL PRÁCE

Cílem předkládané dizertační práce bylo využití různých druhů magnetických i nemagnetických nosičů při studiu reversibilní adsorpce nukleových kyselin (SPRI) a možnost využití v molekulární diagnostice založené na polymerázové řetězové reakci (PCR).

Hlavní cíle práce:

- optimalizace podmínek metody reversibilní adsorpce a následné eluce DNA pro různé druhy magnetických mikro- a nanonosičů
- studium inhibice PCR a PCR v reálném čase testovanými nosiči
- aplikace a optimalizace podmínek reverzibilní imobilizace nukleových kyselin a izolace DNA z komplexních vzorků v kvalitě a množství vhodném pro PCR, PCR v reálném čase a EMA-PCR
- zavedení postupů izolace celkové DNA s využitím pevných nosičů z komplexních reálných vzorků

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4 MATERIÁL

4.1 Bakteriální kultury

V experimentech byly použity bakteriální kmeny *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06 a *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 212/06 získané ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora, Tábor, ČR (Culture Collection of Dairy Microorganisms (CCDM)), bakteriální kmen *Lactobacillus gasseri* K7 ze Sbírký mikroorganismů, Chair of Dairy Science, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Slovinsko a bakteriální kmeny *Bifidobacterium longum* CCM 3764, *Bacillus subtilis* CCM 1999, *Bacillus cereus* CCM 2010^T, *Bacillus licheniformis* CCM 2145^T, *Bacillus circulans* CCM 1611, *Bacillus megaterium* CCM 2037, *Bacillus mycoides* CCM 915 a *Bacillus thuringiensis* CCM 19^T získané z České sbírky mikroorganismů, Brno, ČR (Czech Collection of Microorganisms (CCM)).

4.2 Purifikovaná bakteriální DNA

Purifikovaná bakteriální DNA kmene *Salmonella* o různé koncentraci a vhodné čistotě byla získána od doc. A. Španové, CSc. z Přírodovědecké fakulty Masarykovy university.

4.3 Polymerní magnetické nosiče

Magnetické polymerní mikronosiče P(HEMA-co-GMA), P(HEMA-co-EDMA) a PGMA, termosenzitivní magnetické (NIP 182) a nemagnetické (NIP 23, NIP 26 a NIP 53) nosiče byly připraveny Ing. D. Horákem, CSc. na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze. Nanonosiče manganatého perovskitu $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ byly získány od Doc. Ing. E. Pollerta, DrSc. z Fyzikálního ústavu Akademie věd ČR v Praze.

4.3.1 Vlastnosti polymerních nosičů

Charakteristiku testovaných nosičů, typ polymeru tvořícího vrchní ochrannou vrstvu magnetického jádra, stupeň pokrytí povrchu nosiče karboxylovými funkčními skupinami, obsah Fe v magnetickém jádru nosiče (hmotnostní %), průměr jádra nosiče (μm) bez polymerní ochranné vrstvy a index polydispersity (polydispersity index (PDI)), tedy poměr hmotnosti a počtu nosičů o průměrné velikosti uvádí Tabulka 2.

Tabulka 2: Charakterizace testovaných nosičů

<i>Nosiče</i>	<i>Polymer</i>	<i>Fe</i> (%hm)	<i>-COOH (mM/g)</i>	<i>Průměr nosičů</i> (μm)	<i>PDI*</i>
Fkol 135ox	P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	6,6	2,61	1,0	1,05
Fkol 77ox	P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	10,0	0,764	2,2	1,09
Fkol B100ox	PGMA	5,4	0,67	0,7	1,16
Fkol B30ox	PGMA	6,0	0,42	0,7	1,07
Fkol B29ox	PGMA	2,91	0,41	0,66	n
FH 46ox(2)	P(HEMA- <i>co</i> -EDMA)	6,55	0,85	1,5	1,07
C103	P(HEMA- <i>co</i> -GMA)ox	n	n	1,8	n
C 25	PGMA	14,7	5,4	$159 \cdot 10^{-3}$	n
C 22	PGMA	6,4	1,7	$122 \cdot 10^{-3}$	n
C 9	PGMA	5,5	5,7	$85 \cdot 10^{-3}$	n

<i>Nosiče</i>	<i>typ nosičů</i>	<i>MBAAm</i> (%hm)	<i>-COOH (mM/g)</i>	<i>Fe (%hm)</i>	<i>PDI*</i>
NIP 23	TC	10	n	-	1,03
NIP 26		5	n	-	1,03
NIP 182	MC, TC	20	n	8,1	1,12
NIP 53	TC	5	0,78	-	n
PG 58	kontrolní	12	0,57	-	1,03

*PDI- index polydispersity (poměr hmotnosti a počtu nosičů o průměrné velikosti)

MBAAm (N, N – methylen bisacrylamid) – síťovadlo

n – údaj nezjištěn

4.3.2 Komerčně dodávané magnetické nosiče

Jako kontrola byly použity následující komerčně dodávané magnetické nosiče:

1. magnetické nosiče MPG[®] uncoated (MCPG0510), (Millipore Corp., USA)
2. magnetické sklo – 5 μm (CPG, New York, USA)
3. magnetické nosiče DynaBeads (Dynal, Oslo, Norsko)

4.4 Přístroje

Magnetický separátor Dynal (Oslo, Norsko), MJ Research Programme Cycler PTC-100 (Watertown, USA), PCR cycler DNA thermo cycler Rotogene 6000 (Corbett Research, Australie), UltraLum EB-20E UV transilluminator (Paramount, USA) pro detekci produktů PCR. UV/Vis NanoPhotometer (Implen, Německo) a Nanodrop ND-2000/2000c (Thermo Scientific, USA) pro spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA. Pro provedení agarosový gelové elektroforézy byla použita elektroforetická vana pro horizontální agarosovou gelovou elektroforézu model Owl D2 Wide Gel System (Thermo Scientific Owl Separation Systems, USA). Jako zdroj elektrického proudu byl použit Enduro Power Supplies (Labnet, USA), WPA CO 8000 Cell Density Meter (Biochrom, UK), fotografie byly pořízeny pomocí digitálního fotoaparátu Casio Exiilim (Casio Computer co.Ltd, USA) nebo CD 34 Polaroid kamery (Polaroid, Cambridge, USA). Dále byly použity přístroje: analytické váhy Kern ew (Novotř, SK), laboratorní váhy B0430 (Ohaus, USA), centrifuga MINI Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Německo), minicykler PTC-100TM (MJ Research, Watertown, USA), termostat – Mini incubator (Labnet,

USA), termostat FTC 901 (VELP SCIENTIFICA, Miláno, Itálie), mikrovlnná trouba SMW 5020 (SENCOR, ČR).

4.5 Testované výrobky

4.5.1 Preparát SanyDuo

Testovaným výrobkem byl preparát SanyDuo (ACO Building Drainage (Bedford, UK) jehož přesné složení není známo. Jedná se o preparát určený k čištění silně znečištěných povrchů, zejména tuky a podobnými látkami. Je označován jako „odlučovač“ tuků. Výrobce uvádí, že se jedná o směs látek, které jsou lidskému zdraví a přírodě zcela neškodné. Neobsahuje alkohol, kyselé ani toxické látky. Je licencován v souladu s bezpečnostními EG databázemi v Evropské unii (EG Sicherheitblatt nach 91/225 EWG 648/2004 EC z 1. 9. 2007). [100] Jedná se o zelenou viskózní kapalinu obsahující směs lipolytických mikroorganismů a enzymů.

4.5.2 Vzorky myší stolice

Stolice myší obohacená o probiotický kmen *Lactobacillus gasseri* K7 izolovaný, ze stolice kojenců byla získána od prof. Ireny Rogejl (Universita v Ljubljani, Biotechnologická fakulta, oddělení Zootechniky v Domžale).

4.5.3 Probiotické mléčné výrobky, doplňky stravy

Testované mléčné výrobky a doplňky stravy (probiotické tablety) použité ke stanovení byly zakoupeny v komerční síti. Mléčné náhrady byly získány ve formě reklamních vzorků. Charakteristiku všech výrobků obsahuje Tabulka 3.

Základní členění kysaných mléčných výrobků a předepsané minimální množství živých mikroorganismů v kysaných mléčných výrobcích je stanoveno Vyhláškou Ministerstva zemědělství č.77/2003 Sb. ve znění pozdějších předpisů [101]. Tato vyhláška uvádí, že jogurt je mléčný výrobek obsahující protosymbiotickou směs *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* v množství minimálně 10^7 cfu / 1g (1ml) výrobku. Uvedená vyhláška dále uvádí, že u jogurtových výrobků mohou být kromě základní jogurtové kultury přidávány kmeny produkující kyselinu mléčnou a pomáhající dotvářet specifickou chuťovou nebo texturovou charakteristiku výrobku. Musí však být zachován optimální poměr obou základních kmenů jogurtové kultury [101].

Tabulka 3: Charakterizace testovaných výrobků

Název	Výrobce	Druh	Obsažené bakt. kmeny	Deklarované cfu / 1g (1ml) výrobku	Pomocné látky
Activia bílá	Danone a.s.	kysaný mléčný výrobek s bifidokulturou	jogurtová kultura (<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>), <i>Bifidobacterium sp.</i>	10 ⁷ [101]	bílkoviny, sacharidy, tuk, vápník
Activia, příchuť lesní plody					
Zott bílý	Zott Polska	kysaný mléčný výrobek	jogurtová kultura (<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>)	10 ⁷ [101]	
Bílý jogurt z ovčího mléka, St. Pierre	Jan Maštaliř, St. Pierre				
Gyntima® probiotica	Herb-Pharma SK, s.r.o.	vaginální čípky	n	n	PEG 32, PEG 20, polysorbatum 20, natrii chloridum, magnesi sulphas
Linex® Forte	Sandoz s.r.o.	potravinový doplněk	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5), <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	8.10 ¹⁰	dextrosa, inulin, mikrokrystalická celulosa (E 460), bramborový škrob, oligosacharidy, stearan hořečnatý (E 470b)
Pangamin Bifi s inulinem	Rapeto, a.s., ČR		bifidobakterie a laktobacily (<i>Lactobacillus acidophilus</i>)	n	pivovarské kvasnice <i>Sacharomyces cerevisiae</i> , vitaminy - B1, B2, B6, kyselina pantotenová, pangamová a listová, nicin, biotin, cholin, Ca, P, K, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn
Biopron junior	VALOSUN a.s., ČR	probiotický komplex – doplněk stravy	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i>	5.10 ⁹	fruktooligosacharidy, vanilkové aroma, bramborový škrob
Nutrolin-B Plus	Cipla Ltd., Mumbai, Indie		<i>Bacillus coagulans</i> (<i>Lactobacillus sp.</i>) ATCC 31284	1,6.10 ⁸	vitaminy řady B – B1, B2, B3, B6, B12, kukuřičný škrob, jedlá želatina
Baby Lactum	HERO CZECH s.r.o	pokračující kojenecká výživa	<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>	10 ¹²	*, galaktooligosacharidy, fruktooligosacharidy, laktósa, cholin, taurin, inositol, nukleotidy
Hipp 2 folgemilch	HiPP Österreich GmbH		probiotická bakteriální kultura	n	demineralizovaná syrovátka, odstředěné mléko, rostlinné oleje, škrob, laktósa, fosforečnan vápenatý, citrát vápenatý, vitamín C, citrát železnatý, síran zinečnatý, niacin, kys. pantothenová, vitamín E, síran měďnatý, vitamíny
Beba premium	Nestle Suisse S.A., Švýcarsko		sprejově sušené bakterie mléčného kvašení (termofilní a bifidogenní kultury), <i>Bifidobacterie</i> -Bifidus B _L	n	*, rybí olej, taurin
Junior mléko BIFIDUS			lyofilizované bakterie mléčného kvašení (termofilní a bifidogenní kultury) <i>Bifidobacterie</i> -Bifidus B _L	n	maltodextrin, sušené odtučené mléko, sušená syrovátka, rostlinné oleje, mléčný tuk, sójový lecitin, vitamíny minerální látky, stopové prvky*

n- údaj na výrobku neuveden

5 METODY

5.1 Kultivace mikroorganismů

5.1.1 Rod *Lactobacillus*

10 ml tekutého MRS media (Oxoid, Velká Británie) bylo zaočkováno 100 μ l bakteriální kultury (*Lactobacillus gasseri* K7, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 216/06, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06) uchovávané při -80 °C v 15% glycerolu. Kultivace byla provedena aerobně v termostatu při 37 °C/24 hodin. Kultura narostlá v tekutém živném médiu byla použita pro stanovení počtu buněk. Na základě turbidimetrického měření (Cell Density Meter) byla stanovena koncentrace buněk v 1 ml kultury oproti blanku (čisté MRS medium) s využitím optické denzity (OD) neboli absorbance. Principem je spektrofotometrické měření zákalu při vlnové délce $\lambda = 600$ nm. Výsledky stanovení zákalu byly přiřazeny počtu buněk na základě růstové křivky (kultivace na MRS agaru) pro jednotlivé bakteriální kultury.

Metoda EMA-PCR byla testována pro různé koncentrace bakteriálních buněk ($A_{600} = 1,0, 0,4$ a $0,2$). Ověření čistoty kultury bylo provedeno křížovým roztěrem Petriho misce s MRS agarem (Oxoid, Velká Británie). Zaočkované misky byly umístěny do termostatu a kultivovány při 37 °C 24 hodin. Po kultivaci byl zkontrolován vzhled kolonií na Petriho miskách a jedna kolonie byla použita pro zaočkování dalších Petriho misek s MRS agarem. Kultivace probíhala za stejných podmínek.

5.1.2 Rod *Bifidobacterium*

Bakteriální buňky *Bifidobacterium longum* byly kultivovány anaerobně na MRS mediu (Oxoid, Velká Británie) s cysteinem (0,5 g/l) po dobu 18 hodin při teplotě 37 °C.

5.1.3 Rod *Bacillus*

Bakteriální buňky *Bacillus subtilis* CCM 1999, *Bacillus cereus* CCM 2010^T, *Bacillus licheniformis* CCM 2145^T, *Bacillus circulans* CCM 1611, *Bacillus. megaterium* CCM 2037, *Bacillus mycoides* CCM 915 a *Bacillus thuringiensis* CCM 19^T byly kultivovány aerobně při teplotě 30 °C v kapalném MPA médiu (Čaderský Envitek, ČR) po dobu 48 hodin. Ověření čistoty kultury bylo provedeno křížovým roztěrem Petriho misce s MPA agarem.

Bakteriální buňky izolované z komerčně dodávaném výrobku SanyDuo (ACO Building Drainage, (Bedford, Velká Británie) byly kultivovány aerobně při teplotě 30 °C na Brain Heart Infusion Mediu (BHI) (HiMedia, Čaderský Envitek, ČR) po dobu 48 hodin. Mikroskopicky za pomoci Gramova barvení a tvorby spor byly zařazeny do rodu *Bacillus*.

5.2 Stanovení růstové křivky

Množství bakterií *Lactobacillus gasseri* K7 a *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* CCDM 211/06 v kultivačním médiu bylo zjištěno z růstové křivky. Růstová křivka byla pro obě kultury konstruována pomocí kultivace v MRS mediu odebráním vzorků v hodinových intervalech a měření absorbance při 600 nm. Jako slepý vzorek bylo použito čisté MRS medium.

Po každém proměření absorbance byla odebrána suspenze buněk a po naředění na 10^{-4} , 10^{-5} a 10^{-6} byla vyseta roztěrem na Petriho misky s MRS agarem (byly připraveny 3 paralelní misky).

Kultivace misek byla provedena při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Na základě počtu kolonií na jednotlivých miskách byl proveden výpočet jednotek tvořících kolonii (colony forming units na mililitr (cfu/ml)).

5.3 Příprava hrubých lyzátů buněk

5.3.1 Příprava hrubého lyzátu buněk z bakteriálních kultur

Hrubé lyzáty buněk byly připraveny z 1 ml bakteriální kultury připravené kultivací na MRS mediu při teplotě 37 °C/24 hodin. Po centrifugaci (10 000 ot/5 min.) byl sediment resuspendován v roztoku A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0). Po opakované centrifugaci (10 000 ot/5 min.) byl supernatant slit a sediment resuspendován v 500 µl lyzačního roztoku (lysozym 3 mg/ml, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA; pH 8,0). Vzorky byly ponechány při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny, poté byl k vzorku přidáno 25 µl 10 % SDS a 5 µl proteinasy K (10 µg/ml) a vzorky byly inkubovány při teplotě 55 °C do druhého dne.

5.3.2 Příprava hrubého lyzátu buněk z mléčných výrobků

V případě tekutých mléčných výrobků byl pro přípravu hrubých lyzátů buněk odebrán 1 ml vzorku po předchozí homogenizaci. Pokud byl vzorek ve formě tablety nebo prášku, byl do sterilní Eppendorfovy zkumavky navážen 1 g vzorku.

Vzorek byl resuspendován v 1 ml sterilní vody. Po centrifugaci (10 000 ot/5 min) byl supernatant slit a sediment obsahující buňky byl resuspendován v 1 ml roztoku A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA; pH 8,0). Po opakované centrifugaci byl sediment buněk resuspendován v 500 µl lyzačního roztoku (lysozym 5 mg/ml, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA; pH 8,0). Vzorky byly ponechány při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny, poté bylo přidáno 25 µl 10 % SDS a 5 µl proteinasy K (100 µg/ml) a vzorky byly inkubovány při teplotě 55 °C do druhého dne.

5.3.3 Příprava hrubého lyzátu buněk ze stolice myši

Vzorky myši stolice (50 mg) obsahující buňky probiotického bakteriálního kmene *Lactobacillus gasseri* K7 byly opakovaně promyty 1 ml PBS pufru (137 mM NaCl, KCl 137 mM, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Po centrifugaci (12 000 ot/3 min) byl supernatant slit a sediment obsahující bakteriální buňky resuspendován v 1 ml roztoku A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA; pH 8,0). Po opakované centrifugaci byl k sedimentu napipetován 1 ml bakteriální kultury *Lactobacillus gasseri* K7 (narostlé za 24 hodin, ředění v poměru 1:10, cca 6 x 10⁸ cfu). Po opakované centrifugaci byly pelety buněk resuspendovány v 940 µl lyzačního pufru (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA; pH 8,0; lysozym 10 µg/ml) s 2 µl mutanolysinu (5 U/µl).

Po inkubaci po dobu 1 h při 37 °C byly bakteriální buňky rozrušeny ultrazvukem (3×30 s, 1×15 min); poté bylo přidáno 10 µl proteinasy K (10 mg/ml) a 50 µl vodného roztoku SDS (konečná koncentrace 1%). Inkubací při teplotě 55 °C po dobu 24 h byly připraveny hrubé lyzáty buněk (1 ml).

5.3.4 Příprava hrubého lyzátu buněk z výrobku SanyDuo

Hrubý lyzát bakteriálních buněk získaných po kultivaci výrobku SanyDuo [100] v kapalném BHI médiu byl připraven z 1 ml kultury narostlé v tekutém živném MPA médiu. Bakteriální buňky

obsažené v supernatantu získaného po centrifugaci (10 000 ot/5 min.) byly promyty v 1 ml roztoku A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0) a po opakované centrifugaci (10 000 ot/5 min.) resuspendovány v 500 µl lyzačního roztoku (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8, lysozym 3 mg/ml) a inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Následně bylo do roztoku přidáno 25 µl 10% SDS a 5 µl proteinasy K (100 µg/ml). Roztok byl inkubován po dobu 24 hodin při teplotě 55 °C.

5.4 Izolace DNA

5.4.1 Izolace DNA metodou fenolové extrakce a srážení DNA ethanolem

K hrubému lyzátu buněk (500 µl) byl přidán stejný objem fenolu (předestilovaného, pH 7,8), směs byla kývavým pohybem míchávána po dobu 4 minut. Po centrifugaci (10 000 ot/3 min) byla odebrána vodní fáze obsahující DNA. K vodní fázi s DNA bylo přidáno směsí 700 µl chloroform-cis-isoamylalkoholu (CIZ, 24:1), směs byla promíchávána (4 min). [2] Po centrifugaci (10 000 ot/3 min) byla odebrána vodní fáze do čisté mikrozkušavky.

Ke vzorku DNA byla přidána 1/10 objemu 3 M octanu sodného, směs byla promíchána. Následně byl přidán 2,5 násobek objemu 96 % ethanolu, obsah byl promíchán a DNA byla srážena při -20 °C. [2] Poté byla směs centrifugována (15 000 ot/15 min). Supernatant byl opatrně slit, sediment byl usušen v termostatu a poté byla DNA rozpuštěna v 500 µl TE pufru (pH 7,8).

5.4.2 Izolace DNA komerčními kity

Izolace DNA z hrubých lyzátní buněk bakteriální kultury a reálných vzorků (myší stolice) byla provedena pomocí komerčních izolačních kitů QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo) a Maxwell16 Cell DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA) dle doporučení výrobce.

5.4.3 Izolace DNA komerčními magnetickými částicemi

Separace DNA byla provedena z hrubých lyzátní buněk (HL) v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl pomocí komerčních magnetických nosičů (magnetické nosiče MPG[®], magnetické sklo, magnetické nosiče DynaBeads) o koncentraci 2 mg/ml. Separační směs o celkovém objemu 1000 µl byla připravena smícháním komponent v pořadí NaCl, HL, PEG 6000, magnetické částice, po 15 minutové inkubaci byly magnetické nosiče s navázanou DNA odseparovány magnetem. Nosiče s DNA byly promyty 1000 µl a 500 µl 70% ethanolu a po odseparování magnetem sušeny v termostatu do odpaření ethanolu. Elucí do 100 µl TE pufru při laboratorní teplotě po dobu 15 minut byla z magnetických nosičů uvolněna DNA. Pomocí vnějšího magnetického pole byly z roztoku odstraněny magnetické nosiče a byl odebrán supernatant (eluát) s DNA.

5.4.4 Izolace DNA metodou magnetické separace

Jednotlivé komponenty separační směsi (magnetické nosiče, hrubý lyzát buněk/purifikovaná DNA, PEG a NaCl) byly smíchány, po inkubaci byly pomocí magnetu odseparovány magnetické nosiče s navázanou DNA. Nosiče s DNA byly následně promyty 1000 µl a 500 µl 70% ethanolu a po odseparování magnetem sušeny v termostatu do odpaření ethanolu. Elucí do TE pufru (není-li uvedeno jinak byl objem 100 µl) byla z magnetických nosičů uvolněna DNA. Pomocí vnějšího

magnetického pole byly z roztoku odstraněny magnetické nosiče a byl odebrán supernatant s DNA.

Podmínky separace (teplota, koncentrace), složení a pořadí komponent separační směsi (koncentrace PEG, NaCl, molární hmotnost PEG), podmínky eluce (pH elučního pufru, teplota, doba eluce) byly optimalizovány.

Kvalita a množství izolované DNA byla ověřena pomocí agarosové gelové elektroforézy (0,8% agarosový gel), spektrofotometricky a pomocí PCR.

5.4.4.1 Optimalizace metody reversibilní adsorpce DNA na pevných nosičích

Testování pořadí komponent separační směsi

Separační směs byla složena z polyethylenglykolu (PEG 6000), roztoku chloridu sodného (NaCl), destilované vody, magnetických mikronosičů Fkol 77ox a hrubého lyzátu bakteriálních buněk *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06 ($A_{600nm} = 2,00$). Testovaná pořadí komponent separačních směsí jsou uvedena v Tabulka 4.

Tabulka 4: Testovaná pořadí komponent separační směsi

Pořadí komponent	Separační směs					
	1	2	3	4	5	6
1.	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
2.	NaCl	NaCl	PEG	DNA	NaCl	NaCl
3.	DNA	DNA	DNA	PEG	PEG	nosiče
4.	PEG	nosiče	nosiče	nosiče	nosiče	DNA
5.	nosiče	PEG	NaCl	NaCl	DNA	PEG

Separační směs o celkovém objemu 1000 μ l byla tvořena 100 μ l hrubého lyzátu buněk, 100 μ l magnetických nosičů o různé koncentraci (2, 5 a 10 mg/ml), 200 μ l 40% PEG 6000, 400 μ l 5M NaCl a 200 μ l sterilní vody. Finální koncentrace PEG 6000 byla 8% a 2,5M NaCl. K eluci DNA z magnetických nosičů (doba eluce 30 min.) byl použit TE pufru o objemu 100 μ l o pH 7,8.

Vliv molekulové hmotnosti a koncentrace polyethylenglykolu

Adsorpce DNA byla optimalizována v prostředí 2M NaCl za použití PEG 600 a PEG 6000, jehož finální koncentrace v separační směsi byla 4, 8, 12 a 16% při použití polymerních magnetických nosičů P(HEMA-co-GMA) (2 mg/ml) o objemu 10 μ l v separační směsi. Jako DNA matrice (50 μ l) byla nejprve použita DNA purifikovaná z hrubých lyzátů buněk *Bifidobacterium longum* fenolovou extrakcí [2] a následně hrubé lyzáty buněk *Bifidobacterium longum*. Separační směs byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Nosiče s navázanou DNA byly promyty 500 μ l 70% ethanolu a DNA byla eluována do 50 μ l TE pufru o pH 7,8. Pro kontrolu bylo za shodných experimentálních podmínek použito komerčně dodávané magnetické sklo. Množství purifikované DNA (bakteriální DNA izolovaná fenolovou extrakcí [2]) přidané do separační směsi bylo bráno jako 100%.

Za stejných podmínek byla DNA izolována z reálných vzorků (mléčné výrobky (jogurt), probiotické výrobky).

Vliv koncentrace polyethylenglykolu a chloridu sodného

Celkový objem separační směsi byl 1000 µl, z toho objem purifikované DNA *Lactobacillus gasseri* K7 o koncentraci 200 ng/µl ($A_{260nm/280nm} = 1,84$) byl 100 µl, objem magnetických nosičů Fkol 77 ox (2 mg/ml) 100 µl. Objemy zbývajících složek separační směsi se lišily v závislosti na finální koncentraci PEG 6000 (8 nebo 16%) a NaCl (1,0; 1,5; 2,0 a 2,5 M).

Stanovení bylo provedeno se třemi paralelními vzorky a bylo opakováno. Pro ověření přítomnosti DNA v eluátech a v supernatantech (separační směs po odseparování komplexu nosiče-DNA) byla použita agarosová gelová elektroforéza (0,8% agarosový gel).

5.4.4.2 Optimalizace podmínek eluce DNA z nosičů

Doba eluce DNA z nosičů

Pomocí vybraných separačních směsí (1, 3, 5 a 6) (Tabulka 4) byla testována doba eluce (15, 30, 45 a 60 minut) DNA separované z hrubého lyzátu buněk bakteriálního kmene *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06 z magnetických nosičů P(HEMA-co-GMA).

Složení separační směsi (konečný objem 1000 µl) bylo 100 µl hrubého lyzátu buněk, 100 µl magnetických nosičů (2 mg/ml), 400 µl 40% PEG 6000 a 400 µl 5M NaCl. Finální koncentrace PEG 6000 byla 16% a 2M NaCl. Separační směs byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Nosiče s navázanou DNA byly promyty 1000 µl 70% ethanolu a DNA byla eluována do 100 µl TE pufru o pH 7,8.

Vliv teploty eluce a pH elučního pufru

Separe DNA z hrubých lyzátů buněk *Lactobacillus gasseri* K7 (bakteriální kultura $A_{600nm} = 1,80$, $c = 200$ ng/µl)) a následná eluce DNA z magnetických nosičů (2 mg/ml) byla provedena při různých teplotách (10 a 40°C). Magnetická separace DNA byla provedena za již dříve optimalizovaných podmínek – separační směs č. 1 (Tabulka 4), v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl, eluce do 100 µl TE pufru po dobu 15 minut. Pro optimalizaci eluce DNA z magnetických nosičů byl za uvedených experimentálních podmínek použit TE pufr o pH 7,8, 8,5, 9,01 a 9,5.

Kvalita a množství eluované DNA byla ověřena spektrofotometricky a PCR v reálném čase za využití primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102]. Jako kontrolní metoda byla použita metoda fenolové extrakce [2].

5.4.4.3 Optimalizace podmínek magnetické separace za použití nosičů peroskvit

Testování pořadí komponent separační směsi

Jako výchozí matrice pro optimalizace separační směsi pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů peroskvit byla použita bakteriální DNA *Lactobacillus gasseri* K7 o koncentraci 200 ng/µl ($A_{260/280} = 1,84$). Koncentrace použitých nanonosičů byla 2 mg/ml. Tabulka 5 obsahuje testované separační směsi o rozdílném složení (koncentrace komponent separační směsi) a různém pořadí přidávání komponent do separační směsi (celkový objem 1000 µl). Po vazbě DNA na nosič, promytí etanolem a usušení v termostatu byla DNA z nosiče eluována do 100 µl TE pufru o pH 7,8 přes noc.

Tabulka 5: Testované separační směsi – peroskvit

Pořadí komponent	Separační směs									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	NaCl
2.	NaCl	NaCl	PEG	DNA	NaCl	NaCl	DNA	DNA	PEG	PEG
3.	DNA	DNA	DNA	PEG	PEG	nosiče	NaCl	nosiče	NaCl	DNA
4.	PEG	nosiče	nosiče	nosiče	nosiče	DNA	PEG	NaCl	nosiče	nosiče
5.	nosiče	PEG	NaCl	NaCl	DNA	PEG	nosiče	PEG	DNA	H ₂ O

nosiče – magnetické nosiče peroskvit

Koncentrace DNA separované peroskvitem z purifikované bakteriální DNA *Lactobacillus gasseri* K7 byla stanovena spektrofotometrickým měřením pomocí přístroje Nanodrop ND-2000/2000c. Kvalita eluované DNA byla ověřena v PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria* [103] a rod *Lactobacillus* [102]. Z důvodu vysoké koncentrace byla izolovaná DNA před použitím do PCR směsi 10 x zředěna.

Vyvinutý postup byl použit pro izolaci DNA z probiotických mléčných výrobků s následnou identifikací pomocí PCR. Jako kontrolní metoda izolace DNA z hrubých lyzátů buněk reálných vzorků byla použita metoda fenolové extrakce.

Studium vlivu koncentrace NaCl v separační směsi

Vliv koncentrace NaCl (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 a 2,5 M) v kombinaci s 8% a 16% PEG 6000 na účinnost separace purifikované DNA *Salmonella* o výchozí koncentraci 200 ng/μl ($A_{260nm/280nm} = 1,95$) byl testován za použití separační směsi č. 1 (Tabulka 5).

Celkový objem separační směsi byl 200 μl, objem DNA matrice byl 20 μl, objem NaCl a PEG 6000 se lišil v závislosti na jejich finální koncentraci v separační směsi. V případě potřeby byl objem (200 μl) doplněn byl sterilní vodou. Eluce DNA byla provedena do 100 μl TE pufru o pH 7,8 při laboratorní teplotě.

Kvantifikací v qPCR za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria* [103] metodou absolutní kalibrace byla ověřena koncentrace eluované DNA. Specifita PCR produktů byla potvrzena Melt analýzou a gelovou elektroforézou (velikost PCR produktu 466 bp).

5.4.4.4 Izolace DNA z reálných vzorků magnetickými nosiči

Izolace bakteriální DNA byla provedena metodu magnetické separace v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl. Složky separační směsi byly přidávány v předepsaném pořadí separační směsi č.1 (Tabulka 4). Separační směs byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Magnetické nosiče s navázanou DNA byly odseparovány pomocí magnetu, supernatant odpipetován a po uvolnění magnetického pásu byly zkumavky obsahující magnetické nosiče s navázanou DNA promyty 1000 μl 70% ethanolu. Nosiče byly odseparovány magnetem a po slití ethanolu byly zkumavky vysušeny v termostatu. DNA byla z nosičů eluována do 100 μl TE pufru o pH 7,8 při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Nosiče byly poté odseparovány a eluát byl odpipetován do čisté Eppendorfovy zkumavky.

Jako kontrola byla použita izolace DNA z hrubých lyzátů buněk pomocí fenolové extrakce a komerčně dodávaných magnetických nosičů MPG[®] uncoated (MCPG0510) za shodných experimentálních podmínek (tj. v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl).

Izolace DNA z výrobku SanyDuo

Izolace DNA byla provedena v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl pomocí polymerních magnetických částic P(HEMA-co-GMA) (Fkol 77 ox) o koncentraci 2 mg/ml. Byla použita separační směs č. 1 (Tabulka 4), složky separační směsi byly přidávány v předepsaném pořadí. Separační směs byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Magnetické nosiče s navázanou DNA byly odseparovány pomocí magnetu, supernatant odpipetován a po uvolnění magnetického pásu byly zkumavky obsahující magnetické nosiče s navázanou DNA promyty 1000 μ l 70% ethanolu. Nosiče byly odseparovány magnetem a po slití ethanolu byly zkumavky vysušeny v termostatu. DNA byla z nosičů eluována do 100 μ l TE pufru o pH 7,8 při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Nosiče byly poté odseparovány a eluát byl odpipetován do čisté Eppendorfovy zkumavky.

5.4.4.5 Izolace DNA pomocí termosensitivních nosičů

DNA purifikovaná metodou fenolové extrakce z bakteriální kultury *Lactobacillus gasseri* K7 a hrubé lyzáty buněk připravené z čisté bakteriální kultury a komplexních vzorků byla použita jako výchozí matrice pro izolaci pomocí magnetických nosičů NIP 182. Byla použita separační směs č.1 (Tabulka 4) o celkovém objemu 1000 μ l, složená z 16% PEG 6000, 2 M NaCl. Jednotlivé komponenty byly přidávány v uvedeném pořadí. Po smíchání všech složek byla DNA vázána na nosič po dobu 15 minut, následně byly nosiče pomocí magnetického pásu odseparovány, poté promyty 1000 μ l 70% ethanolu a usušeny v termostatu při teplotě 55 °C. DNA byla z nosiče eluována do 100 μ l TE pufru o pH 7,8 přes noc.

Tabulka 6: Teploty adsorpce a eluce DNA

	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
Adsorpce (°C)	40	10	40	10	40	10
Eluce (°C)	40	10	10	40	LT	LT

Adsorpce a následná eluce DNA byla provedena při různých teplotách (Tabulka 6). Všechny použité komponenty byly před použitím vytemperovány na odpovídající teplotu.

5.5 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace a čistota DNA izolované fenolovou extrakcí [2] a metodou magnetické separace byla měřena na univerzálním NanoPhotometru (Corbett Research, Austrálie), na kterém lze měřit velmi malé objemy vzorku (μ l) pomocí speciálních Label Gard mikrolitrových kyvet a Nanodropu ND-2000/2000c (Thermo Scientific, USA).

Po kalibraci byly proměřeny vzorky a na displeji přístroje byly odečteny následující hodnoty: koncentrace DNA a hodnoty absorbance při uvedených vlnových délkách $A_{230\text{nm}}$, $A_{260\text{nm}}$, $A_{280\text{nm}}$, $A_{320\text{nm}}$ a jejich poměry $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, $A_{260\text{nm}}/A_{320\text{nm}}$.

Z hodnot absorbance při vlnové délce 260 nm (vlnová délka, při které dochází k maximální absorpci UV záření nukleovými kyselinami) byla vypočtena koncentrace DNA. Koncentraci DNA lze stanovit z absorbance $A_{260\text{nm}} = 1$, která odpovídá koncentraci 50 ng/ μ l dsDNA nebo 37 ng/ μ l ssDNA (pro optickou dráhu 1 cm). Do výsledné koncentrace byl započítán faktor zředění a délka optické dráhy (viz. Lid faktor) i korekce pozadí (hodnota při A_{320}). Vztah pro výpočet koncentrace ds DNA pomocí NanoPhotometru je $c_{\text{DNA}} = (A_{260\text{nm}} - A_{320\text{nm}}) \times 50 \times \text{Lid faktor}$ [ng/ μ l].

Z poměru absorbancí A_{260}/A_{280} je stanovena čistota izolované DNA. Vlnová délka 280 nm odpovídá maximu absorpce záření proteiny. Poměr absorbancí čisté DNA se pohybuje v rozmezí 1,8 – 2,0, obsahuje-li vzorek proteiny je poměr $< 1,8$, v případě obsahu RNA je $A_{260nm}/A_{280nm} \geq 2,0$. Hodnota absorpce při vlnové délce 230 nm odpovídá maximu absorpce fenolu. [74]

5.6 Amplifikace DNA

Amplifikace byla prováděna v celkovém objemu amplifikační směsi 25 μ l v DNA v MJ Research Programme Cycleru PTC-100 (Watertown, USA) a PCR cycleru DNA thermo cycler Rotogene 6000 (Corbett Research, Austrálie). Amplifikační směsi byly připravovány ve formě master mixů, jejich složení a použité programy jsou uvedeny v následujícím textu. Komponenty PCR a qPCR amplifikační směsi byly zakoupeny u firmy Top-Bio, (Praha, ČR) fluorescenční barvico EvaGreen pro provedení qPCR bylo od firmy Biotium (USA). Použité primery byly syntetizovány firmou Generi Biotech (Hradec Králové, ČR). V případě potřeby byl amplifikační produkt uchováván při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.6.1 Konvenční polymerázová řetězová reakce

Amplifikovatelnost DNA izolované magnetickými nosiči z různých typů vzorků byla ověřena pomocí PCR za využití dvou různých sad primerů specifických pro doménu *Bacteria* [103], [104], primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102], primerů specifických pro gen gassericin A kmene *Lactobacillus gasseri* K7 [105] a primerů specifických pro rod *Bacillus* [106].

Tabulka 7: Charakteristika použitých primerů

Cílová DNA	Primer	Sekvence primeru (5'-3')	produkt PCR (bp)	Citace
doména <i>Bacteria</i>	F_eub	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	466	[103]
	R_eub	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT		
	DG74	AGGAGGTGATCCAACCGCA	370	[104]
	RW01	AACTGGAGGAAGGTGGGGAT		
rod <i>Lactobacillus</i>	LbLMA_1	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	250	[102]
	R_16	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA		
bakteriocin gassericin K7	LFA_185	GTT GCA GGA TCA TGT G	84	[105]
	LFA_268	TGT TGC AGC TCC GTT A		
rod <i>Bacillus</i>	BK_1/F	TCACCAAGGCACGATGCG	1095	[106]
	BK_1/R1	CGTATTACCGCGGCATG		

Sekvence použitých primerů a velikost produktů PCR obsahuje Tabulka 7, složení odpovídajících PCR směsí je uvedeno v Tabulce 8. V Tabulce 9 jsou shrnuty podmínky amplifikace pro jednotlivé primery. Před prvním cyklem byla vždy provedena počáteční denaturace 5 min/ $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, na závěr polymerizace byl poslední krok cyklu PCR prodloužen na 10 minut

Tabulka 8: Složení PCR směsí konvenční PCR

<i>Komponenta</i>	<i>Směs pro PCR*</i>				
	F_eub R_eub	DG 74 RW01	LbLMa_1 R_16	LFA_185 LFA_268	BK-1/F BK-1/R1
voda pro PCR	18,0	13,0	19	19	40,7
10x reakční pufr kompletní (1,5 mM Mg ²⁺ iontů)	2,5	5,0	2,5	2,5	-
10x reakční pufr bez MgCl ₂	-	-	-	-	5,0
dNTP směs (10 mM)	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0
2,5 mM MgCl ₂	-	-	-	-	4
primer 1 (10 pmol/μl)	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5
primer 2 (10 pmol/μl)	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5
Taq 1.1 DNA polymerasa (1U/μl)	1,0	2,0	1,0	1,0	0,3
DNA matrice	1,0	2,0	1,0	1,0	2,0

* konečný objem 25 μl; celkový objem směsi pro PCR při použití primerů BK-1/F a BK-1/R1 byl 50 μl

Tabulka 9: Podmínky DNA amplifikace v PCR

<i>Krok</i>	<i>Teplota (oC)</i>	<i>Čas (s)</i>	<i>Počet cyklů</i>
doména <i>Bacteria</i> - primery F_eub, R_eub			
denaturace DNA	95	30	
hybridizace primerů	55	30	30
syntéza řetězce DNA	72	30	
doména <i>Bacteria</i> – primery DG74, RW01			
denaturace DNA	95	60	
hybridizace primerů	57	60	35
syntéza řetězce DNA	72	60	
rod <i>Lactobacillus</i> – primery LblMa_1, R_16			
denaturace DNA	95	30	
hybridizace primerů	55	30	30
syntéza řetězce DNA	72	30	
bakteriocin gassericin K7 – LFA_185, LFA_268			
denaturace DNA	95	30	
hybridizace primerů	54	60	35
syntéza řetězce DNA	72	30	
rod <i>Bacillus</i> – BK-1/F, BK-1/R1			
denaturace DNA	95	60	
hybridizace primerů	63	60	30
syntéza řetězce DNA	72	60	

5.6.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Amplifikace DNA izolované magnetickými nosiči z různých typů vzorků byla ověřena pomocí PCR v reálném čase za využití primerů specifických pro doménu *Bacteria* [103] (velikost produktů PCR 466 bp) a primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102] (velikost PCR produktů 250 bp).

Pro kvantifikaci byla použita metoda absolutní kvantifikace. Byla připravena kalibrační křivka, ze které bylo přímo odečítáno množství DNA ve směsi pro PCR. Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí softwaru PCR cyklu Rotorgene 6000 (verze 1. 7. 87). Odpovídající množství DNA bylo vypočteno pomocí Ct hodnoty z kalibrační křivky. Hodnota Ct neboli práh detekce, představuje číslo cyklu, kdy došlo k překročení prahové hodnoty fluorescence na počátku exponenciální fáze amplifikace. Reakční účinnost (r. e.) byla vypočtena pomocí lineární regrese sklonu amplifikačních křivek (M) (Rovnice 4). Robustnost metody byla odhadnuta na základě korelačního koeficientu lineární regrese (R^2).

Tabulka 10: Složení PCR směsi pro qPCR

Komponenta	Směs pro PCR* - primery			
	F_eub	LbLMA_1	LFA_185	BK-1/F
	R_eub	R_16	LFA_268	BK-1/R1
voda pro PCR	9,5	9,5	10,5	9,5
qPCR SYBR Green master mixu	12,5	12,5	12,5	12,5
primer 1 (10 pmol/μl)	1,0	1,0	0,5	1,0
primer 2 (10 pmol/μl)	1,0	1,0	0,5	1,0
DNA matrice	1,0	1,0	1,0	1,0

* konečný objem 25 μl

Sekvence použitých primerů, velikost PCR produktů a teplota tání odpovídajících PCR produktů je uvedena v Tabulce 7. Složení odpovídající PCR směsi pro PCR v reálném čase uvádí Tabulka 10.

Podmínky amplifikace v qPCR pro jednotlivé primery byly shodné s konvenční PCR a jsou shrnuty uvedeny v předchozí kapitole (Tabulka 9). Před prvním cyklem byla vždy provedena počáteční denaturace 5 min/95 °C, na závěr polymerizace byl poslední krok cyklu PCR prodloužen na 10 minut. Jako poslední krok byl zařazen tzv. Melt program, během kterého je teplota zvyšována od 50 °C na 95 °C, přičemž po každém zvýšení teploty o 1 °C je po dobu 1 s snímána fluorescence vzorku.

5.6.3 Restrikční analýza amplifikované ribosomální DNA

Amplikony (1095 bp), připravené amplifikací DNA za použití primerů specifických pro rod *Bacillus* [106] byly purifikovány metodou magnetické separace pomocí magnetického nosiče P(HEMA-co-GMA) funkcionalizovaného karboxylovými skupinami (-COOH 0.764 mM/g) v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl. DNA byla z magnetických nosičů eluována do TE pufru (pH 7,8) o objemu 50 μl. Přechištěné PCR produkty byly štěpeny restrikčními endonukleasami *Tag*^oI (NewEngland BioLabs) a *Alu*I (NewEngland BioLabs) při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin. PCR produkty a naštěpené amplikony byly detekovány agarózovou gelovou elektroforézou (1,5% agarosový gel).

Získané restriční profily sekvence amplikonů byly porovnány s odpovídajícími sekvencemi dostupnými v databázi GenBank dostupné na elektronických stránkách <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

5.7 Inhibiční vliv magnetických nosičů na průběh amplifikace DNA

Možnost interference magnetických nosičů v PCR byla studována na základě amplifikace purifikované DNA v přítomnosti různého objemu testovaných nosičů ve směsi pro PCR. Jako kontrola byla použita purifikovaná DNA *Salmonella* (1 µl) o výchozí koncentraci 100 ng/µl ($A_{260/280nm} = 1,97$). Z této DNA byla ředění 100 ng/µl, 10 ng/µl, 1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl a 1 pg/µl. Kvantifikace DNA byla provedena pomocí PCR v reálném čase metodou absolutní kvantifikace za využití primerů specifických pro doménu *Bacteria* [103].

Nanonosiče manganatého peroskvitu

Směs pro PCR o celkovém objemu 25 µl obsahovala 12,5 µl qPCR SYBR Green master mixu, 1 µl každého primeru, 1 µl DNA *Salmonella* (o koncentraci 100 ng/µl, 10 ng/µl, 1 ng/µl, 100 pg/µl, a 10 pg/µl) a odpovídající objem nanonosičů peroskvit (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0 a 9,0 µl). Celkový objem použité směsi pro PCR byl 25 µl (konečný objem byl doplněn vodou pro PCR).

Magnetické a termosensitivní nosiče

Směs pro PCR o celkovém objemu 25 µl obsahovala 0,5 µl 10 mM dNTP, 0,5 µl (10 pmol/µl) každého primeru, 0,5 µl Taq 1.1 polymerasy (1 U/µl), 2,5 µl 10xPCR reakčního pufru bez obsahu Mg^{2+} , 4 µl 2,5 mM $MgCl_2$, 2 µl fluorescenčního barviva EvaGreen (Biotium, USA), 1 µl DNA *Salmonella* (o koncentraci 100 ng/µl, 10 ng/µl, 1 ng/µl, 100 pg/µl, a 10 pg/µl) a odpovídající objem nanonosičů peroskvit (0,5; 2,5 a 5,0 µl). Celkový objem použité směsi pro PCR byl 25 µl (konečný objem byl doplněn vodou pro PCR).

Statistické zhodnocení získaných dat bylo provedeno pomocí Software Rotorgene 6000 cycler (verze 1.7.87). Odpovídající množství DNA bylo vypočteno na základě C_t hodnoty za použití sestrojené standardní křivky (DNA *Salmonella*) – variační koeficient, $c_{DNA} = 0.00004 - 4.0$ ng/µl.

5.8 Agarosová gelová elektroforéza DNA a detekce produktů PCR

Ověření kvality izolované DNA a detekce amplifikovaného PCR produktu byla provedena pomocí agarosové gelové elektroforézy. Velikost detekovaného produktu PCR byla ověřena za využití DNA standardu (100 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR).

Odpovídající navážka agarosu (0,8% agarosový gel pro detekci DNA, 1,8% agarosový gel pro detekci PCR produktů, 1,5 % agarosový gel pro detekci restričních fragmentů – metoda ARDRA) byla rozpuštěna ve 100 ml 0,5 x koncentrovaného TBE pufru a suspenze byla důkladně rozvařena v mikrovlnné troubě za opakovaného promíchávání. Roztok byl ochlazen na teplotu zhruba 60 °C a poté byl nalit do čisté vaničky (s hřebínkem) položené na rovné ploše. Po zatuhnutí (30 minut) byl na gel nanášen vzorek DNA smíchaný se Stop pufrem (6 x koncentrovaný) v poměru 5:1. Vzorky byly nanášeny do komůrek vzniklých po vyjmutí hřebínku. Gel byl opatrně převrstven 0,5x koncentrovaným TBE pufrem (do výšky 2- 3 mm nad agarosový gel). Elektroforéza probíhala při vloženém napětí o velikosti 60 V po dobu 90 minut. Gel byl barven v roztoku ethidiumbromidu (0,5 µg/ml) po dobu 30 minut. Obarvený gel byl opláchnut v destilované vodě a prohlížen na transiluminátoru v UV světle (305 nm). Pro dokumentaci byl gel vyfotografován digitálním fotoaparátem.

5.9 Metoda rozlišení živých a mrtvých buněk

5.9.1 Ověření působení EMA na DNA

DNA *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06 (finální koncentrace 10 ng/μl) purifikovaná metodou magnetické separace (viz. kapitola 5.4.3) pomocí magnetických P(HEMA-co-GMA) nosičů o objemu 450 μl byla inkubována při laboratorní teplotě s 50 μl EMA (Sigma, St. Lois, USA) (koncentrace 0,1 mg/ml) po dobu 5 minut. Poté byly vzorky 5 minut ozařovány halogenovou lampou (500 W) ze vzdálenosti 20 cm na ledu.

Schopnost (1, 2 a 5 μl) amplifikace DNA byla ověřena PCR za použití primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102]. Produkty PCR (250 bp) byly detekovány pomocí agarosové gelové elektroforézy na 1, 8% agarosovém gelu.

5.9.2 Optimalizace koncentrace a doby působení EMA na buňky

Optimalizace metody EMA-PCR byla provedena za využití buněk bakteriálního kmene *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06.

Inaktivace bakteriálních buněk byla testována za použití roztoku 1% formaldehydu v PBS (3 hodiny), 70% isopropanolu (10, 20, 30 min.), var (30 min) a vzájemné kombinace roztoku 1% formaldehydu v PBS (20 min) a varu (15 min), 70% isopropanolu (20 min) a varu (15 min). Kontrola životaschopnosti bakteriálních buněk byla provedena křížovým roztěrem na MRS agar a následnou kultivací při teplotě 37°C po dobu 6 dnů.

Inaktivované a živé bakteriální buňky (450 μl) byly vystaveny působení ethidium monoazidu (EMA; 0,1 mg/ml; 50 μl). Různá množství živých a inaktivovaných buněk ($A_{600nm} = 1,0; 0,4$ a $0,2$) byly po centrifugaci, při laboratorní teplotě inkubovány s EMA (0,1 mg/ml) po dobu 5, 10 a 20 minut. Po inkubaci byl roztok 2, 5 a 10 minut ozařován halogenovou lampou (500 W) ze vzdálenosti 20 cm (na ledu). Po fotoaktivaci byla provedena centrifugace (10 000 ot/3 min.). Sediment byl opakovaně promýván a následně resuspendován v 500 μl fyziologického roztoku s MgSO₄. Paralelně byl připraven i vzorek bez působení EMA.

Ověření amplifikovatelnosti DNA byl prováděn pomocí rodově specifické PCR za využití primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102]. Produkty PCR (250 bp) byly detekovány pomocí agarosové gelové elektroforézy na 1, 8% agarosovém gelu. Do PCR směsi bylo použito 1 μl hrubých lyzátů buněk po působení i bez působení EMA.

5.9.3 Separace DNA po působení EMA pomocí magnetických nosičů

Po působení EMA byly buňky opakovaně centrifugovány (10 000 ot/3 min.) a sediment byl resuspendován v 500 μl fyziologického roztoku s MgSO₄ (0,01 M MgSO₄, 0,85% NaCl). Lyze buněk byla provedena varem (15 min.) s následným ochlazením na ledu.

Purifikace DNA byla provedena metodou magnetické separace pomocí magnetických nosičů P(HEMA-co-GMA) o koncentraci (2 mg/ml) v prostředí 8% PEG 6000 a 2M NaCl. Složky separační směsi byly přidávány v předepsaném pořadí a objemu (Tabulka 11). Separací směs byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Magnetické nosiče s navázanou DNA byly odseparovány pomocí magnetu, supernatant odpipetován a po uvolnění magnetického pásu byly zkumavky obsahující magnetické nosiče s navázanou DNA promyty 1000 μl 70% ethanolu. Nosiče byly odseparovány magnetem a po slítí ethanolu byly zkumavky vysušeny v termostatu. DNA byla z nosičů eluována do 100 μl TE pufru o pH 7,8 při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Nosiče byly poté odseparovány a eluát byl odpipetován do čisté Eppendorfovy zkumavky.

Tabulka 11: Složení separační směsi (EMA-PCR)

<i>Pořadí</i>	<i>Komponenta</i>	<i>Objem (μl)</i>
1.	H ₂ O	200
2.	NaCl (5M)	400
3.	DNA	100
4.	PEG (40%)	200
5.	Magnetické nosiče (2 mg/ml)	100
<i>Výsledný objem (μl)</i>		1000

5.9.4 Porovnání působení EMA a PMA

V Eppendorfových zkumavkách byl 1 ml buněčné kultury bakteriálního kmene *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06 ($A_{600nm} = 1,00$) centrifugován (15 000 ot./min po dobu 5 min.), sediment byl promyt sterilní vodou a opětovně stočen. Paralelně byly připraveny 2 sady vzorků – s buňkami inaktivovanými a neinaktivovanými.

Inaktivace buněk byla provedena působením kombinace varu (15 minut) a 70% izopropanolu (20 min). Kontrola životaschopnosti bakteriálních buněk byla ověřena křížovým roztěrem na MRS agaru a následnou kultivací při teplotě 37 °C po dobu 6 dnů. Inaktivované a živé bakteriální buňky (450 μl) byly vystaveny působení ethidium monoazidu (EMA) nebo propidium monoazidu (PMATM (Biotinum, Hayward, USA) (0,1 mg/ml; 50 μl). Po inkubaci (5 min.) byl roztok 5 minut ozařován halogenovou lampou (500 W) ze vzdálenosti 20 cm (na ledu). Po fotoaktivaci byla provedena centrifugace (10 000 ot/3 min.). Sediment byl opakovaně promýván a následně resuspendován v 500 μl fyziologického roztoku s MgSO₄. Lyze buněk byla provedena varem 15 min.

Získaný lyzát buněk byl přečištěn metodou magnetické separace v prostředí 8% PEG 6000 a 2M NaCl pomocí nosičů Fkol 77ox (2 mg/ml) dle návodu uvedeném v kapitole 5.9.3. DNA byla z nosičů eluována do 100 μl TE pufru o pH 7,8 při laboratorní teplotě po dobu 30 minut.

Amplifikace DNA rodu *Lactobacillus* byla provedena pomocí PCR za využití primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102]. Produkty PCR (250 bp) byly detekovány pomocí agarosové gelové elektroforézy na 1, 8% agarosovém gelu. Do PCR směsi bylo použito 1 μl hrubých lyzátů buněk po působení i bez působení EMA (PMA).

5.9.5 Aplikace působení EMA-PCR na reálné vzorky

Vyvinutá metoda působení EMA na bakteriální buňky byla za účelem rozlišení živých a mrtvých buněk aplikována na vybraný mléčný výrobek, kterým byl bílý jogurt Klasik (OLMA, Olomouc) s různou dobou expirace (před a po datu expirace). Ze zvoleného mléčného výrobku byly připraveny tři paralelní vzorky. Obsah testovaného výrobku (jogurtu) byl homogenizován. Do 1,5 ml Eppendorfových zkumavek byl odebrán 1 ml vzorku, vzorky byly centrifugovány (14 000 ot/5 min.), supernatant slit a sediment resuspendován v 1 ml sterilní vody. Promytí sterilní vodou bylo opakováno třikrát. Získaný sediment buněk byl resuspendován v 500 μl fyziologického roztoku s MgSO₄ (0,01M MgSO₄, 0,85% NaCl). Buňky byly lyzovány a z hrubého lyzátu byla DNA izolována s použitím magnetických P(HEMA-co-GMA) nosičů o koncentraci (2 mg/ml) v prostředí 8% PEG 6000 a 2M NaCl (viz. 5.9.3). Složky separační směsi byly přidávány v předepsaném pořadí a objemu (Tabulka 11).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky jsou zpracovány ve formě komentáře k publikacím, které jsou součástí předkládané dizertační práce ve formě příloh. Odkaz na konkrétní publikace vztahující se dané problematice je uveden na konci příslušné diskuze. Dosud nepublikované výsledky nebo výsledky, které byly odeslány k publikaci (před termínem odevzdání dizertační práce nebylo známo zda byly přijaty k publikaci) včetně odpovídajících tabulek nebo obrázků jsou zpracovány v textu podrobněji. Výsledky jsou tematicky rozděleny do kapitol a zvlášť diskutovány.

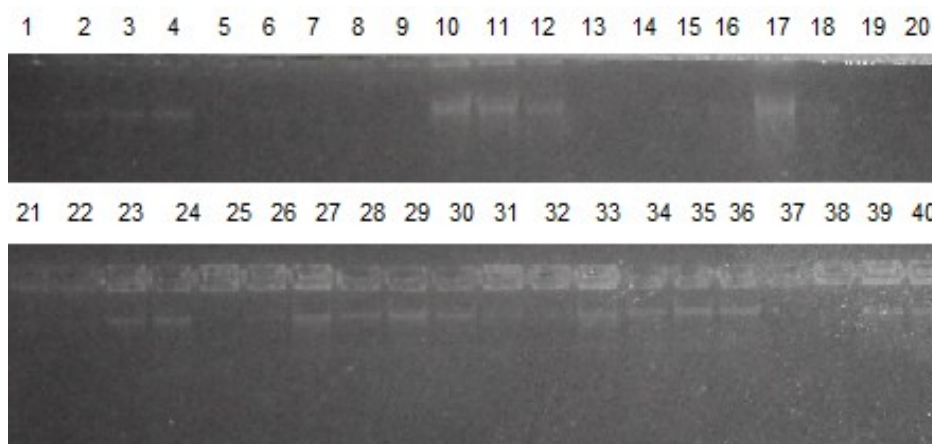
6 OPTIMALIZACE PODMÍNEK REVERSIBILNÍ ADSORPCE DNA NA PEVNÉ NOSIČE

Metoda reversibilní imobilizace nukleových kyselin na pevné fázi (SPRI) byla prováděna v prostředí dvoufázového systému, tvořeného roztokem polymeru (PEG 6000) a chloridu sodného (NaCl) o různé konečné koncentraci. Pro optimalizaci podmínek reversibilní imobilizace bakteriální DNA na pevné fázi byly použity neporézní magnetické P(HEMA-*co*-GMA) mikronosiče pokryté karboxylovými funkčními skupinami (pracovně označovanými jako Fkol 77ox a Fkol 135ox) lišícími se zejména množstvím funkčních skupin (charakteristika použitých nosičů (Tabulka 2)).

Pozornost byla zaměřena na přípravu a složení separační směsi, stanovení vhodné koncentrace magnetického nosiče a podmínek eluce DNA z magnetického nosiče. Bylo testováno množství a kvalita desorbované DNA v závislosti na podmínkách SPRI, na pořadí komponent separační směsi a koncentraci magnetických nosičů.

6.1 Testování pořadí komponent v separační směsi

Testované separační směsi obsahovaly polyethylenglykol (PEG 6000), roztok chloridu sodného (NaCl), destilovanou vodu, magnetické nosiče Fkol 77ox a hrubý lyzát bakteriálních buněk *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06. Separace byla provedena za podmínek a dle postupu uvedeného v kapitole 5.4.4.1. Pořadí komponent separační směsi, které byly testovány při optimalizaci podmínek separace jsou uvedeny ve stejné kapitole (Tabulka 4). Gelovou elektroforézou bylo prokázáno, že v eluátech získaných po 30 minutové eluci byla přítomna DNA (Obrázek 12). Gelovou elektroforézou supernatantů bylo potvrzeno, že v separační směsi po oddělení magnetických nosičů s navázanou DNA zůstává značné množství DNA. Z tohoto důvodu byla následně věnována pozornost stanovení separační schopnosti magnetických nosičů.



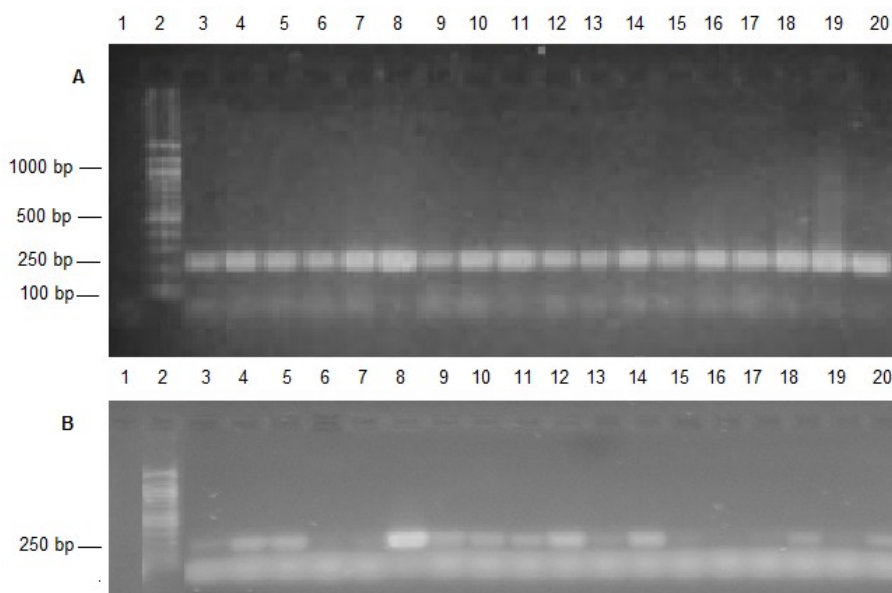
Obrázek 12: Gelová elektroforéza DNA v eluátech (běh č. 5 - 22) a v supernatantech (běh č. 23 - 40) po izolaci s rozdílným pořadím komponent separační směsi a různým množstvím magnetického nosiče

Na gel bylo nanášeno 30 μ l DNA. Běh (1) standard 35 ng/ μ l, (2) standard 70 ng/ μ l, (3) 140 ng/ μ l, (4) 210 ng/ μ l, (5–10) a (23–28) mag. nosiče Fkol 77ox, c = 2 mg/ml, (11 – 16) a (29 – 34) mag. nosiče Fkol 77ox, c = 5 mg/ml, běh č. (17 - 20) a (35 – 40) mag. nosiče Fkol 77ox, c = 10 mg/ml. Běh č. (5, 11, 17) a (23, 29, 35): separační směs č. 1, (6, 12, 18) a (24, 30, 36): separační směs č. 2, (7, 13, 19) a (25, 31, 37): separační směs č. 3, (8, 14, 20) a (26, 32, 38): separační směs č. 4, (9, 15, 21) a (27, 33, 39): separační směs č. 5, (10, 16, 22) a (28, 34, 40): separační směs č. 6.

Množství DNA v eluátech (ng) detekované na gelu bylo odhadnuto pomocí hmotnostního standardu (purifikovaná DNA v množství 35, 70, 140 a 210 ng). S využitím různého pořadí separačních směsí bylo detekováno různé množství eluované DNA (přibližně 0-1200 ng). Pořadí separačních směsí podle množství eluované DNA je následující: separační směs 1 (1200 ng) > 6 (850 ng) > 2 (800 ng) > 5 (320 ng) > 3 (200 ng) > 4 (0 ng). Číselné označení separační směsi odpovídá Tabulka 4. Nejmenší množství eluované DNA bylo získáno s použitím separačních směsí č. 3 a č. 4, do nichž byl přidáván NaCl jako poslední.

Výsledky byly ověřeny amplifikací DNA v konvenční PCR s následnou gelovou elektroforézou. DNA izolovaná pomocí metodu SPRI s využitím magnetického nosiče o koncentraci 2, 5 a 10 mg/ml byla použita jako DNA matrice v PCR za využití primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102].

Kromě neředěné DNA byla jako DNA matrice použita 100x ředěná DNA. Ve všech případech s použitím neředěné DNA se amplifikoval intenzivní PCR produkt (Obrázek 13 - gel A). S použitím 100 x ředěné DNA se amplifikovaly PCR produkty různé intenzity (Obrázek 13 - gel B). Různá intenzita PCR produktů pravděpodobně odráží různé množství eluované DNA. Vzhledem k citlivosti PCR se amplifikovala i malá množství DNA, která nebyla při gelové elektroforéze DNA v eluátech (Obrázek 12) detekována.



Obrázek 13: Gelová elektroforéza PCR produktu specifických pro rod *Lactobacillus* (250 bp), (po izolaci DNA s rozdílným pořadím komponent separační směsi a různým množstvím magnetického nosiče).

Gel (A) – neředitelný eluát DNA,

Gel (B) – 100x vyředitelný eluát DNA.

Běh (1) negativní kontrola, (2) žebříček 100 bp, (3,4,5) separační směs 1 – mag. nosiče $c = 2, 5, 10$ mg/ml, (6, 7, 8) separační směs 2 – mag. nosiče $c = 2, 5, 10$ mg/ml, (9, 10, 11) separační směs 3 – mag. nosiče $c = 2, 5, 10$ mg/ml, (12, 13, 14) separační směs 4 – mag. nosiče $c = 2, 5, 10$ mg/ml, (15, 16, 17) separační směs 5 – mag. nosiče $c = 2, 5, 10$ mg/ml, (18, 19, 20) separační směs 6 – mag. nosiče $c = 2, 5, 10$ mg/ml.

Získané výsledky potvrzují, že pořadí komponent v separační směsi ovlivňuje množství eluované DNA. Z dosažených výsledků můžeme usuzovat, že účinnost jednotlivých separačních směsí souvisí s mechanismem vazby DNA na použitý magnetický nosič. Mechanismus reverzibilní DNA adsorpce na povrch magnetických nosičů nesoucích karboxylové funkční skupiny je evidentně založen na nekovalentních interakcích komplexní povahy. V přítomnosti vysoké koncentraci solí a PEG dochází ke kondenzaci DNA molekul do kompaktního a relativně hustého stavu. Tento kolaps DNA makromolekuly ve vodném roztoku obsahující PEG a NaCl o vysoké koncentraci byl již dříve opakovaně studován [63]-[69].

Potvrzením platnosti této teorie je výsledek, kdy za testovaných experimentálních podmínek byly z hlediska koncentrace izolované DNA nejméně účinné separační směsi, v nichž byl NaCl přidáván jako poslední v pořadí.

Na základě uvedených závěrů bylo pro další stanovení zvoleno pořadí komponent separační směsi č. 1 (Tabulka 4). Základním požadavkem je přesné dodržení uvedeného pořadí komponent. Vliv koncentrace magnetických nosičů v separační směsi je vyhodnocen v kapitole (6.4.1).

6.2 Testování vhodné koncentrace komponent separační směsi

Zvolené pořadí komponent a složení separační směsi bylo ověřeno izolací DNA *Lactobacillus gasseri* K7 o známé koncentraci (200 ng/μl) ($A_{260nm/280nm} = 1,84$) pomocí separační směsi č. 1 (Tabulka 4).

6.2.1 Vliv molekulové hmotnosti a koncentrace polyethylenglykolu

Pozornost byla věnována nejen koncentraci, ale i molární hmotnosti PEG v separační směsi. Separační směs obsahovala PEG 6000 nebo PEG 600 o různé koncentraci (4, 8, 12 a 16%) a 2M NaCl.

Při použití PEG 6000 bylo dosaženo vyšší účinnosti separace DNA (zhruba dvojnásobné) než tomu bylo v případě použití PEG 600. Nejvyšší účinnost separace byla dosažena v přítomnosti 2M NaCl a PEG 6000 o koncentraci 12 a 16%. Shodné výsledky, tedy nejvyšší výtěžnost za použití PEG o vyšší molární hmotnosti a koncentraci byl dosaženo i za použití kontrolního nosiče, tj. magnetického skla.

Vyvinutá metoda byla použita pro izolaci DNA z hrubých lyzátů buněk z reálných mléčných výrobků. Výsledky se shodují s výsledky dosaženými po aplikaci na hrubé lyzáty buněk připravené z čisté bakteriální kultury. Jako kontrolní metoda byla použita metoda fenolové extrakce. Bylo potvrzeno, že citlivost metody SPRI je nižší než citlivost fenolové extrakce [2], množství izolované DNA jsou však dostatečná pro provedení PCR detekce. Výhodou použití metody SPRI je odstranění případných inhibitorů PCR reakce a tedy zisk DNA v kvalitě vhodné pro PCR.

Výsledky byly publikovány a jsou podrobněji uvedeny ve formě odborného článku [68] uvedeném v příloze dizertační práce.

6.2.2 Vliv koncentrace polyethylenglykolu a chloridu sodného

Při testování vhodné koncentrace PEG a NaCl byly zachovány podmínky separace za použití separační směsi č.1 (Tabulka 4). Výsledky separace jsou uvedeny v Tabulka 12. V případě, že množství DNA přidané do separační směsi bylo bráno jako 100%, tak nejvyšší eluované množství DNA bylo 33% za použití 16% PEG 6000 a 22,5% v případě 8% PEG 6000. Získaná data potvrzují výsledky uvedené v předchozí kapitole 6.2.1. Nicméně, jak ukazují výsledky prezentované v dříve publikovaných pracích [68], [107] i v případě nižších koncentrací PEG 6000 a NaCl v separační směsi bylo množství DNA eluované za těchto podmínek dostatečné pro úspěšné provedení amplifikace v PCR.

Tabulka 12: Optimalizace finální koncentrace PEG 6000 a NaCl

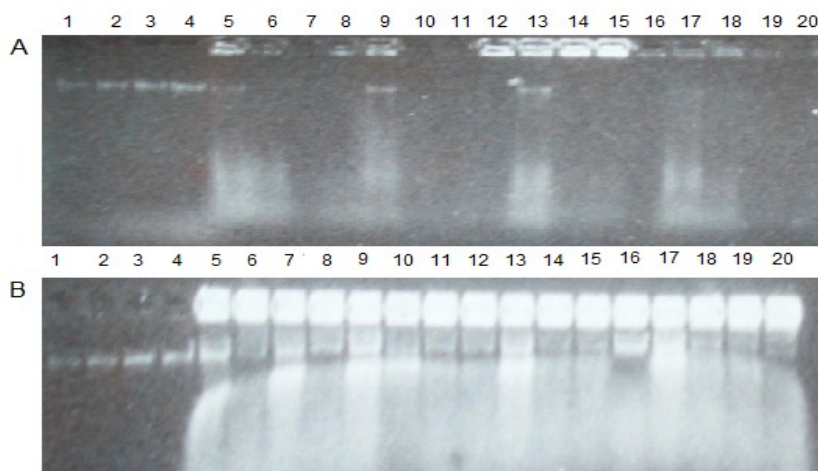
<i>NaCl (M)</i>	<i>PEG 6000 (%)</i>	
	<i>8.0</i>	<i>16.0</i>
<i>návratnost DNA (%)</i>		
1,0	7,0	15,0
1,5	10,0	25,0
2,0	12,0	33,0
2,5	22,5	-

6.3 Eluce DNA z nosičů

6.3.1 Doba eluce DNA

Pomocí vybraných separačních směsí (1, 3, 5 a 6) (Tabulka 4) byla testována doba eluce DNA (15, 30, 45 a 60 minut) separované z hrubého lyzátu buněk bakteriálního kmene *Lactobacillus*

paracasei subsp. *paracasei* CCDM 211/06 z magnetického nosiče P(HEMA-*co*-GMA) (Fkol 77ox). DNA byla eluována do 100 µl TE pufru o pH 7,8.

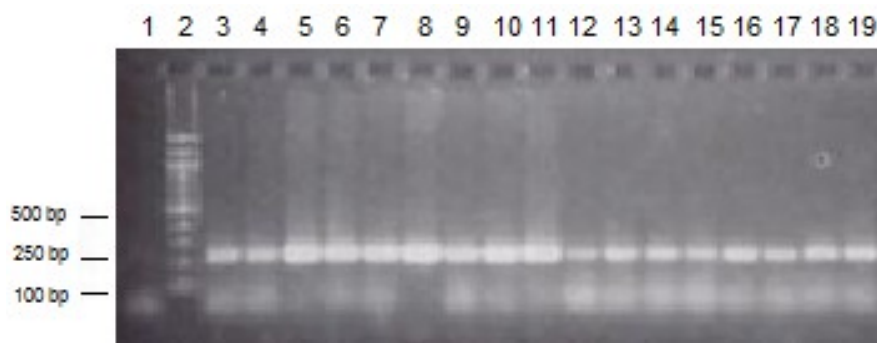


Obrázek 14: Gelová elektroforéza DNA v eluátech (A) a supernatantech (B) po izolaci magnetickým nosičem

P(HEMA-*co*-GMA) (Fkol 77ox) o koncentraci 2 mg/ml s různou dobou eluce (15, 30, 45 a 60 minut). Na gel bylo nanášeno 10 µl DNA.

Běh (1) standard 70 ng/µl, (2) standard 105 ng/µl, (3) standard 140 ng/µl, (4) standard 175 ng/µl, (5, 9, 13, 17) separační směs 1, eluce 15, 30, 45 a 60 min., (6, 10, 14, 18) separační směs 3, eluce 15, 30, 45 a 60 min., (7, 11, 15, 1) separační směs 5, eluce 15, 30, 45 a 60 min., (8, 12, 16, 20) separační směs č. 6, eluce 15, 30, 45 a 60 min.

Výsledky optimalizace doby eluce DNA z magnetických nosičů potvrdily výběr pořadí komponent separační směsi a již dříve dosažené výsledky. DNA byla prokázána v eluátech i supernatantech. Množství DNA (v ng) vizualizované na gelu bylo odhadnuto pomocí hmotnostního standardu (purifikovaná DNA v množství 70, 105, 140 a 175 ng) (Obrázek 14). V eluátech byla nejvyšší intenzita DNA detekována v případě separační směsi č. 1 (Tabulka 4) po eluci trvající 30 a 45 minut. DNA v množství asi 70 ng byla detekována u separační směsi č. 1 (Tabulka 4) i po 15 minutové eluci. Amplifikací DNA v PCR specifické pro rod *Lactobacillus* [102] bylo prokázáno, že ve všech eluátech byla obsažena DNA v kvalitě a množství vhodném pro PCR (Obrázek 15).



Obrázek 15: Gelová elektroforéza PCR produktů specifických pro rod *Lactobacillus* (250 bp) DNA byla amplifikována po izolaci magnetickým nosičem P(HEMA-*co*-GMA) o koncentraci 2 mg/ml s různou dobou eluce (15, 30, 45 a 60 minut). Na gel bylo nanášeno 10 µl PCR produktů.

Běh (1): negativní kontrola, (2) žebříček 100 bp, (3) pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus gasseri* K7 c=10 ng/µl), (4, 5, 6, 7) separační směs 1, eluce 15, 30, 45 a 60 min., (8, 9, 10, 11) separační směs 6, eluce 15, 30, 45 a 60 min., (2, 13, 14, 15) separační směs 3, eluce 15, 30, 45 a 60 min., (16, 17, 18, 19) separační směs č. 5, eluce 15, 30, 45 a 60 min.

Pro další práci byla zvolena doba eluce 15 minut, která je v kombinaci s použitím separační směsi č.1 (Tabulka 4) dostatečná pro následnou detekci DNA metodu PCR. Časový interval byl zvolen i v závislosti na uživatelské přijemnosti metody.

6.3.2 Teplota eluce a pH elučního pufru

Magnetická separace DNA byla provedena za již dříve optimalizovaných podmínek – separační směs č. 1 (Tabulka 4), prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl, eluce do 200 µl TE pufru po dobu 15 minut. Byl studován vliv teploty eluce a pH elučního pufru použitého pro eluci separované DNA z magnetických nosičů P(HEMA-co-GMA) (Fkol 77ox) na výtěžnost separace.

Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA v eluátech potvrdilo poznatek, že vyšší množství DNA bylo izolováno pomocí magnetických nosičů s vyšším obsahem karboxylových funkčních skupin (2,61 mM/g namísto 0,764 mM/g) navázaných na povrchu těchto nosičů.

Při vyhodnocování vlivu pH na eluční schopnost, bylo nutné vzít v úvahu změnu pH TE pufru v závislosti na teplotě. Při zohlednění tohoto vlivu, kdy pKa TE pufru se zvyšuje přibližně o 0,03 jednotky při poklesu teploty o 1 °C [110] bylo nejlepších výsledků, tedy nejvyšší koncentrace eluované DNA dosaženo při pH 8,5 a 7,8 a to při teplotě 10 i 40 °C. Teplota, při které separace DNA probíhá má vliv na výtěžnost eluce. Se stoupající teplotou stoupá separační schopnost, tedy i množství izolované DNA. Výsledky jsou shrnuty v Tabulka 13.

Tabulka 13: Izolace DNA pomocí magnetických neporézních nosičů P(HEMA-co-GMA) (Fkol 77ox) – testované teploty a pH elučního pufru

-COOH (mM/g)	Eluce DNA							
	teplota eluce (°C) / pH elučního pufru / koncentrace eluované DNA (ng/µl)							
	10				40			
	7.8	8.5	9.0	9.5	7.8	8.5	9.0	9.5
0,764	6,7±1,7	9,3±0,8	6,5±0,3	7,3±2,1	23,0±1,4	15,8±2,6	17,0±0,7	14,5±0,3
2,610	47,5±1,6	83,0±0,7	53,5±1,7	51,5±2,2	81,5±2,2	62,5±1,7	56,5±2,8	44,5±1,9

6.4 Vliv magnetických nosičů

Byl studován také vliv koncentrace použitých magnetických nosičů v separační směsi (2, 5 a 10 mg/ml) a obsah karboxylových funkčních skupin na povrchu těchto nosičů.

Pozornost byla věnována různým typům magnetických i nemagnetických nosičů a jejich separační schopnosti za daných experimentálních podmínek. Byl studován vliv teploty separace a eluce pH elučního pufru, složení separační směsi, konkrétně byla pozornost zaměřena na konečnou koncentraci polyethylenglykolu v separační směsi (8% nebo 16% PEG 6000).

6.4.1 Koncentrace magnetických nosičů v separační směsi

Testování koncentrace magnetických nosičů v separační směsi bylo spojeno s optimalizací pořadí komponent separační směsi uvedených v kapitole 6.1.

Největší množství eluované DNA bylo získáno s použitím magnetického nosiče o koncentraci 2 mg/ml a 5 mg/ml v prostředí separační směsi č. 1 a 6 (Tabulka 4). Z dosažených výsledků vyplývá, že množství izolované DNA závisí jen zčásti na koncentraci magnetického nosiče.

Na základě agarózové gelové elektroforézy izolované DNA (Obrázek 12) výsledků izolace DNA a také z úspěšných důvodů zvolena koncentrace magnetických nosičů P(HEMA-*co*-GMA) (Fkol 77ox) 2 mg/ml.

6.4.2 Vliv obsahu karboxylových skupin na izolaci DNA

Studium vlivu obsahu karboxylových skupin navázaných na povrchu magnetických nosičů na výťažek izolace bylo provedeno pomocí P(HEMA-*co*-GMA) nosičů s odlišným množstvím karboxylových skupin na jejich povrchu (Fkol 135ox a Fkol 77ox). Bližší charakterizace testovaných nosičů je uvedena v Tabulce 2.

Separace DNA byla provedena v prostředí PEG 6000 (8 a 16%) a NaCl (1,0; 1,5; 2,0 a 2,5 M) za použití DNA *Lactobacillus* purifikované metodou fenolové extrakce o koncentraci 100 ng/μl. Spektrofotometricky stanovené koncentrace DNA eluované z nosičů za testovaných podmínek (separace při laboratorní teplotě, eluce DNA do 100 μl TE pufru o pH 7,8) jsou shrnuty v Tabulce 14.

Tabulka 14: Množství izolované DNA při použití magnetických neporézních nosičů P(HEMA-*co*-GMA) s různým obsahem –COOH skupin

Nosiče	PEG 6000 (%)	8				16			
	koncentrace NaCl (M)	1,0	1,5	2,0	2,5	1,0	1,5	2,0	2,5
	-COOH (mM/g)	koncentrace eluovaná DNA (ng/μl)							
Fkol 77ox	0,764	7,5	8,0	10,0	20,5	13,2	18,0	29,0	-
Fkol 135ox	2,610	35,0	41,0	55,3	65,0	46,0	53,0	62,0	-

Množství eluované DNA bylo následně ověřeno kvantifikací pomocí primerů specifických pro doménu *Bacteria* [103] za využití metody qPCR. Kvantifikované množství DNA bylo přibližně shodné s množstvím použitým do PCR směsi (určeno na základě spektrofotometrického stanovení). Byl potvrzen předpoklad, že množství eluované DNA souvisí s obsahem karboxylových funkčních skupin na povrchu nosičů. Pomocí nosičů s vyšším počtem karboxylových funkčních skupin bylo izolováno vyšší množství DNA.

6.4.3 Testování různých typů magnetických polymerních nosičů

Schopnost separace nukleových kyselin byla testována pro různé druhy magnetických polymerních nosičů (charakteristika nosičů je uvedena v Tabulce 2).

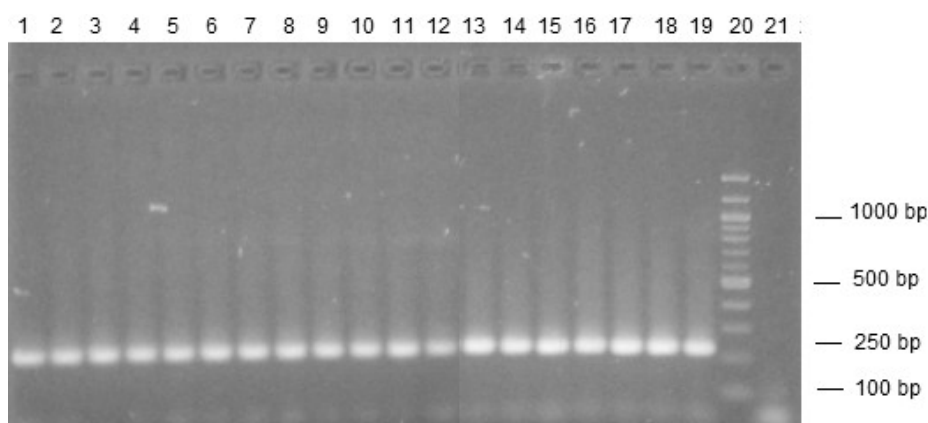
Separací schopnost byla ověřena izolací DNA z hrubých lyzátů buněk bakteriální kultury *Lactobacillus gasseri* K7 ($A_{600nm} = 2,00$) v prostředí dvoufázového vodného systému složeného z 16% PEG 6000 a 2M NaCl, při teplotě 10 °C, 40 °C a při laboratorní teplotě (LT) dle návodu uvedeném v kapitole 5.4.3.

Množství DNA izolované za daných podmínek je pro jednotlivé nosiče uvedeno v Tabulce 15. Na základě porovnání s parametry testovaných nosičů (Tabulka 2), byly potvrzeny výše uvedené závěry (kapitola 6.4.2), že množství izolované DNA souvisí s obsahem karboxylových funkčních skupin, kterými byl funkcionalizován povrch připravených magnetických polymerních nosičů.

Tabulka 15: Izolace DNA různými typy magnetických polymerních nosičů

<i>Teplota separace</i>		<i>Testované kombinace teplot adsorpce a eluce</i>		
		40 °C	LT	10 °C
<i>Testované nosiče</i>	<i>-COOH (mM/g)</i>	<i>Koncentrace DNA (ng/ul)</i>		
Fkol 77ox	0,764	27,5	19,3	17,0
Fkol 135ox	2,610	80,3	55,3	51,5
Fkol B 100ox	0,67	24,7	21,4	11,4
Fkol B 30ox	0,42	28,4	37,0	16,9
Fkol B 29ox	0,41	16,7	8,0	7,7
FH 46ox:2	0,85	21,5	17,9	14,0

Experiment potvrdil, že vybrané druhy magnetických polymerních nosičů lze použít pro izolaci DNA v kvalitě a množství vhodném pro detekci PCR metodou. Ověření kvality izolované DNA bylo provedeno amplifikací v PCR za využití primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102] (Obrázek 16).



Obrázek 16: Gelová elektroforéza PCR produktu získaného amplifikací DNA izolované různými druhy magnetických polymerních nosičů pomocí primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102], velikost PCR produktu 250 bp.

Běh č.: (1-6) DNA izolovaná při teplotě 10 °C, (7-12) DNA izolovaná při laboratorní teplotě, (13-18) DNA izolovaná při teplotě 40 °C, (19) pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus* 10 ng/ul), (20) žebříček 100 bp, (21) negativní kontrola. Běh č. (1, 7, 12) nosiče Fkol 77ox, (2, 8, 13) Fkol 135 ox, (3, 9, 14) Fkol B100ox, (4, 10, 15) Fkol B 30ox, (5, 11, 16) Fkol B 30ox, (6, 12, 18) Fkol B 29ox(2).

6.5 Diskuze

Bylo potvrzeno, že metoda izolace DNA využívající reverzibilní imobilizaci DNA na různé druhy polymerních magnetických nosičů v prostředí PEG 6000 a NaCl je vhodná pro izolaci DNA z hrubých lyzátů bakteriálních buněk. Metoda magnetické separace využívající magnetické nosiče je vhodnou metodou izolace a purifikace genomové DNA [11], [12], [14], [29], [68]. Optimalizací metody je možné dosáhnout výtěžků DNA v množství a kvalitě dostatečné pro aplikaci metod PCR i qPCR.

Na základě podmínek, které byly s úspěchem použity pro separaci nukleových kyselin lze usoudit na mechanismus separace. Dle získaných výsledků má pořadí komponent použitých při přípravě separační směsi vliv na množství eluované DNA [68]. Účinnost separace zřejmě souvisí s mechanismem vazby DNA na magnetický nosič a kondenzací molekul DNA. DNA molekula

představuje v neutrálním pH díky přítomnosti fosfátových skupin záporně nabitý polymer (polyanion). Díky obsahu dusíkatých bází vykazuje zároveň schopnost tvorby vodíkových vazeb, určitou míru hydrofobnosti a má sklon k vytváření π - π interakcí. V prostředí vysoké koncentraci PEG a NaCl dochází ke kondenzaci DNA do kompaktního a relativně hustého stavu [53]. Mechanismus reverzibilní adsorpce kondenzované DNA na povrch polymerních nosičů, nesoucích na svém povrchu záporně nabitě funkční skupiny (např. karboxylové funkční skupiny) je komplexní povahy a dosud nebyl plně objasněn. Existuje jen málo údajů k adsorpci DNA kondenzované v přítomnosti PEG a NaCl na povrch nosičů. [68] Na základě studií vazby DNA na nosiče pokryté vrstvou silikagelu, kdy autoři [88] předpokládají, že adsorpce kondenzované DNA na hydrofodní křemičitý povrch je doprovázena změnou ve struktuře DNA. V jejím důsledku jsou hydrofobní báze přístupné k interakci s hydrofilním povrchem nosičů. V analogii s tímto závěrem, je možné předpokládat, že dusík obsažený v bázích DNA v kondenzovaném stavu interaguje s povrchem magnetických nosičů P(HEMA-*co*-GMA) pokrytými vrstvou PEG. [68] Lze se tedy domnívat, že molekuly DNA v kondenzovaném stavu interagují s modifikovaným povrchem hydrofilních nosičů (pokrytých hydroxylovými nebo karboxylovými skupinami) v prostředí vysokých koncentrací PEG, který je díky svým nepolárním vlastnostem vázán na hydrofobní pozici [57]. Předpokládá se, že záporně nabitě fosfátové skupiny se nijak významně interakcí neúčastní [68].

Dosažené výsledky také potvrzují původní předpoklad [111], že množství eluované DNA souvisí s množstvím karboxylových funkčních skupin navázaných na povrchu použitých magnetických nosičů. Pomocí nosičů s vyšším počtem karboxylových funkčních skupin bylo izolováno vyšší množství DNA.

Výsledky optimalizace metody reversibilní imobilizace DNA za použití magnetických polymerních nosičů P(HEMA-*co*-GMA) byly publikovány ve formě plakátového sdělení v rámci XII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Masarykova univerzita, Brno (2008), Mezinárodní probiotické a prebiotické konferenci (IPC), Košice, SR (2010) a 7th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, Vancouver, Canada (2008), ve formě publikace *Separation of PCR-ready DNA from dairy products using magnetic hydrophilic microspheres and poly(ethylene glykol)-NaCl water solutions* [68] uvedené v příloze dizertační práce.

7 INTERFERENCE MAGNETICKÝCH NOSIČŮ V PCR

Pro stanovení inhibičního vlivu vybraných druhů magnetických i nemagnetických nosičů na průběh PCR byla použita metoda PCR v reálném čase (qPCR), kdy byla porovnávána účinnost amplifikace v závislosti na množství testovaných nosičů v PCR směsi.

Bylo testováno 10 druhů nano- a mikronosičů jejichž charakteristika je uvedena v kapitole 4.3.1 (Tabulka 2) a 3 typy komerčně dostupných magnetických částic určených pro práci s nukleovými kyselinami. Hlavní skupinu tvořily magnetické polymerní neporézní nosiče P(HEMA-*co*-GMA), P(HEMA-*co*-EDMA), PGMA pokryté karboxylovými funkčními skupinami. Dále byly testovány termosenzitivní magnetické a nemagnetické poly(N-isopropylacrylamid) mikronosiče - PNIPAAm, nanonosiče manganatého peroskvitu $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$. Jako pozitivní kontrola byly použity vzorky obsahující pouze purifikovanou DNA (bez přítomnosti nanonosičů).

7.1 Magnetické polymerní nosiče

Pro testování interference magnetických polymerních neporézních nosičů v PCR, bylo vybráno 10 typů nosičů (Tabulka 2) lišících se velikostí, obsahem magnetických jader, druhem polymeru tvořícího ochranou polymerní vrstvu a tím i způsobem přípravy a stupněm polydispersity (PDI). Všechny testované nosiče byly úspěšně použity pro izolaci DNA z hrubých lyzátů bakteriálních buněk.

Schopnost interference testovaných magnetických nosičů v PCR byla stanovena na základě změny průběhu amplifikace v důsledku přítomnosti různého množství nosičů v PCR směsi. Vliv na průběh amplifikace DNA byl proveden statistickým vyhodnocením pomocí Software Rotorgene 6000 cycleru (verze 1. 7. 87) porovnáním směrnice křivky (M), reakční účinnosti (r.e.) a korelačního koeficientu reakce (R^2). Optimální podmínky kvantifikace (Tabulka 1) za využití metody absolutní kvantifikace považují za přijatelnou hodnotu směrnice amplifikační křivky (M) v rozsahu -3,9 až -3,0, což odpovídá účinnosti reakce 80 – 110%. V případě hodnoty korelačního koeficientu (R^2), který je měřítkem přesnosti reakce, jsou výsledky $R^2 \leq 0,985$ považovány za nespolehlivé [71].

Získané výsledky (Tabulka 16) ukazují, že ze všech testovaných nosičů ovlivňují průběh amplifikace v PCR 3 typy nosičů (Fkol 135 ox, Fkol B30 ox, C 103) v množství vyšším než 5 μg na 25 μl PCR směsi a jeden druh nosičů (C 25) již při množství 1 μg na 25 μl . Stejně tak byla interference v PCR prokázána v přítomnosti všech testovaných druhů komerčně dostupných magnetických nosičů (finální koncentrace 2 mg/ml) určených pro práci s nukleovými kyselinami. U jmenovaných nosičů byla hodnota směrnice kalibrační křivky (M), účinnosti reakce (r.e.) a hodnota korelačního koeficientu (R^2) mimo požadovaný rozsah (Tabulka 1). Naproti tomu u nosičů FKol 77ox, FKol B100ox, FKol B29ox, FKol 46ox:2, C 9 a C 22 nebyla za daných experimentálních podmínek prokázána interference v PCR.

Výsledky kvantifikace byly potvrzeny detekcí specifických produktů PCR metodou gelové elektroforézy (466 bp) a Melt analýzou ($T_m = 90^\circ\text{C}$) ampliconů (výsledky nejsou uvedeny).

Tabulka 16: Vliv magnetických nosičů na účinnost amplifikace čase za použití fluorescenčního barviva SYBR Green (lineární regresní analýza).

<i>Nosiče</i>	<i>Množství nosičů ($\mu\text{g}/25\ \mu\text{l}$ směsi pro PCR)</i>	<i>M</i>	<i>r.e. (%)</i>	<i>R²</i>	<i>k.v. (%)</i>
Fkol 135 ox	0	-3,8	83	0,9999	1,1 – 3,3
	1	-3,8	83	0,9998	1,7 – 5,0
	5	-3,7	85	0,9869	16,5 – 36,8
	10	-2,9	123	0,2582	-
Fkol 77 ox	0	-3,3	100	0,9998	1,2 – 9,4
	1	-3,3	101	0,9999	0,3 – 1,9
	5	-3,3	102	0,9981	3,3 – 22,7
	10	-3,2	103	0,9932	6,3 – 38,5
Fkol B30 ox	0	-3,3	100	0,9997	1,3 – 9,9
	1	-3,3	101	0,9999	0,5 – 3,5
	5	-3,2	104	0,9885	8,4 – 47,0
	10	-3,1	109	0,9325	22,3 – 113,1
Fkol B100 ox	0	-3,3	100	0,9998	1,1 – 8,7
	1	-3,3	101	1,0000	0,0 – 0,7
	5	-3,3	102	0,9989	2,4 – 17,6
	10	-3,2	104	0,9928	6,5 – 39,4
Fkol B 29 ox	0	-3,3	100	0,9998	1,0 – 7,7
	1	-3,3	101	1,0000	0,1 – 0,2
	5	-3,3	101	0,9996	1,5 – 11,5
	10	-3,2	103	0,9960	4,8 – 31,0
FH 46 ox:2	0	-3,3	100	0,9998	1,1 – 8,7
	1	-3,3	100	0,9997	1,4 – 10,9
	5	-3,3	102	0,9991	2,2 – 16,3
	10	-3,3	102	0,9985	2,9 – 20,5
C 103	0	-3,5	92	0,9959	7,4 – 28,9
	1	-3,5	93	0,9998	1,1 – 8,5
	5	-3,5	94	0,9996	2,3 – 7,9
	10	-2,6	156	0,2645	-
C 9	0	-3,5	92	0,9953	7,9 – 31,6
	1	-3,5	92	0,9955	7,9 – 30,5
	5	-3,5	92	0,9963	7,0 – 27,4
	10	-3,5	93	0,9983	4,8 – 17,8
C 25	0	-3,5	92	0,9959	7,4 – 28,9
	1	-2,0	216	0,0644	-
	5	-	-	-	-
	10	-	-	-	-
C 22	0	-3,5	92	0,9966	6,8 – 26,4
	1	-3,5	92	0,9976	7,0 – 25,6
	5	-3,5	92	0,9958	7,5 – 29,6
	10	-3,3	97	0,9945	10,4 – 25,6
Magnetické sklo	0	-3,5	92	0,9958	7,5 – 29,7
	1	-2,5	151	0,1978	-
	5	-2,5	154	0,1830	-
	10	-2,0	218	0,0631	-
DynaBeads	0	-3,5	92	0,9958	7,4 – 29,3
	1	-	-	-	-
	5	-2,4	164	0,1474	-
	10	-2,6	144	0,2354	-
MPG [®] uncoated	0	-3,5	92	0,9959	7,4 – 29,0
	1	-2,2	177	0,1150	-
	5	-	-	-	-
	10	-	-	-	-

R² - korelační koeficient, M - směrnice amplifikačních křivek, r.e. - reakční účinnost, k.v. - variační koeficient (relativní směrodatná odchylka)

7.2 Termosenzitivní nosiče

Stejná metoda jako v případě magnetických polymerních nosičů byla aplikována při stanovení interference v PCR u termosenzitivních magnetických (NIP 182) a nemagnetických nosičů (NIP 23, NIP 26 a NIP 53) a nosičů PG 58. Charakteristika testovaných nosičů je uvedena v Tabulce 2.

Tabulka 17: Vliv termosenzitivních nosičů na účinnost amplifikace čase za použití fluorescenčního barviva SYBR Green (lineární regresní analýza).

Nosiče	Množství nosičů ($\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$ směsi pro PCR)	M	r.e. (%)	R^2	k.v. (%)
NIP 53	0	-3,5	92	0,9954	7,8- 31,1
	1	-3,5	94	0,9987	8,6 – 68,6
	5	-3,6	95	0,9998	1,6 – 5,0
	10	-3,4	96	0,9996	2,5 – 7,1
NIP 23	0	-3,5	92	0,9956	7,6 – 30,2
	1	-3,5	92	0,9968	9,1 – 40,4
	5	-3,5	93	0,9972	6,1 – 23,4
	10	-3,4	94	0,9999	0,8 – 2,7
NIP 26	0	-3,5	92	0,9960	7,3 – 28,5
	1	-3,5	92	0,9980	9,2 – 4,5
	5	-3,5	93	0,9981	5,0 – 18,5
	10	-3,5	94	0,9998	1,5 – 5,1
NIP 182	0	-3,5	92	0,9955	7,7 – 30,6
	1	-3,5	92	0,9960	9,0 – 16,6
	5	-3,5	92	0,9939	8,9 – 36,5
	10	-3,5	93	0,9984	4,6 – 17,1
PG 58	0	-3,5	92	0,9957	7,5 – 29,8
	1	-3,5	92	0,9066	8,0 – 18,9
	5	-3,5	93	0,9991	3,4 – 12,3
	10	-3,3	97	0,9905	8,6 – 21,9

R^2 - korelační koeficient, M - směrnice amplifikačních křivek, r.e. - reakční účinnost, k.v. - variační koeficient (relativní směrodatná odchylka)

Výsledky statistické analýzy získaných dat (Tabulka 17) potvrdily, že testované nosiče množství 1 až 10 μg na 25 μl PCR směsi neovlivňují amplifikaci DNA. Hodnoty korelačního koeficientu (R^2), směrnice amplifikačních křivek (M) a reakční účinnost (r.e) se u všech testovaných nosičů pohybovaly v rozsahu charakteristickým pro optimální podmínky kvantifikace (Tabulka 1).

7.3 Nanočástice manganatého peroskvitu

Možnost interference nanočástic $\text{La}_{0,75}\text{Sr}_{0,25}\text{MnO}_3$ v qPCR byla studována na základě amplifikace purifikované DNA v přítomnosti různého objemu nanonosičů v PCR směsi.

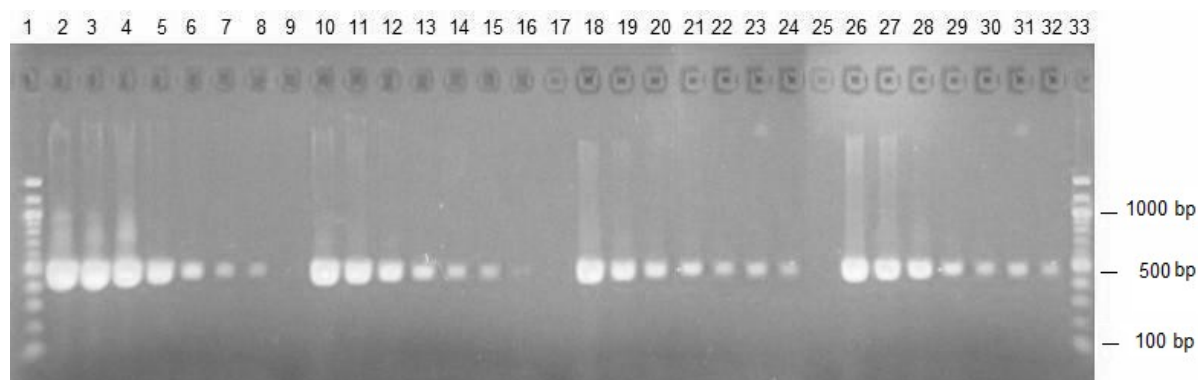
Reakční účinnost kvantifikace DNA v přítomnosti různého množství peroskvitu byla shodná pro standardy (purifikovaná DNA) a testované směsi DNA a nanonosičů manganatého peroskvitu (Tabulka 18). Z toho lze usuzovat, že přítomnost nosičů peroskvitu v PCR směsi neovlivňuje amplifikaci DNA.

Tabulka 18: Vliv nanočástic na účinnost amplifikace v qPCR - Sybr Green (regresní analýza)

<i>Nanonosiče ($\mu\text{g}_{\text{LSMO}}/25 \mu\text{l}$ směsi pro PCR)</i>	<i>M</i>	<i>r.e. (%)</i>	<i>R²</i>	<i>k.v. (%)</i>
0	-3,1	108,0	0,9906	0,3 – 54,5
0,71	-3,2	103,9	0,9961	2,7 – 31,1
1,42	-3,4	98,2	0,9970	5,2 – 36,1
2,84	-3,3	99,9	0,9978	4,9 – 20,6
4,26	-3,9	79,9	0,9963	11,4 – 26,9
5,68	-3,2	100,7	0,9918	20,7 – 63,6
8,52	-3,0	114,0	0,9926	10,0 – 47,6
11,36	-3,4	97,9	0,9997	2,8 – 6,5
12,78	-3,4	97,1	0,9975	1,0 – 22,8

R^2 - korelační koeficient, M - směrnice amplifikačních křivek, r.e. - reakční účinnost, k.v. - variační koeficient (relativní směrodatná odchylka)

Uvedené výsledky byly potvrzeny provedením gelové elektroforézy produktů PCR (Obrázek 17). Intenzita PCR produktů bez přítomnosti a v přítomnosti různého množství nanonosičů $\text{La}_{0,75}\text{Sr}_{0,25}\text{MnO}_3$ (2, 6 a 9 μl nosičů v PCR směsi o celkovém objemu 25 μl) je shodná.



Obrázek 17: Gelová elektroforéza - studium inhibičního vlivu nanonosičů $\text{La}_{0,75}\text{Sr}_{0,25}\text{MnO}_3$. Produkty qPCR (466 bp) specifické pro doménu *Bacteria* [78].

DNA matrice – DNA *Salmonella* o koncentraci v PCR směsi $4 \cdot 10^{-1}$, $4 \cdot 10^{-2}$, $4 \cdot 10^{-3}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-5}$ a $4 \cdot 10^{-6}$ ng/ μl .

Běh č.: (1, 33) žebříček 100 bp, (2-8) 0 μl nosičů v PCR směsi, (10-16) 2 μl nosičů v PCR směsi, (18-24) 6 μl nosičů v PCR směsi, (26-32) 9 μl nosičů v PCR směsi, (9,17,25) negativní kontrola.

Za uvedených experimentálních podmínek bylo prokázáno, že 9 (12,78 μg LSMO/ 25 μl PCR směsi) a méně μl suspenze nanonosičů v celkovém objemu PCR směsi 25 μl nijak neovlivňuje průběh amplifikace ani kvantifikace DNA v qPCR.

7.4 Diskuze

Účinnost amplifikace DNA v PCR (qPCR) může být snížena přítomností celé řady látek [1], [11], [69], [77], [78]. Se zvyšující se koncentrací těchto inhibitorů dochází ke snížení účinnosti amplifikace. Stanovení účinnosti amplifikace porovnáním základních parametrů regresní analýzy kvantifikace v qPCR, tedy lze použít pro detekci případné inhibice PCR reakce.

PCR mohou inhibovat také magnetické nosiče, jejich kovová jádra tvořená oxidy železa, zejména magnetitem Fe_3O_4 ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$) a maghemitem $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, které ve své mřížce obsahují ionty Fe^{2+} a Fe^{3+} nebo jinými kovy, jako je Cu, Co, Mn [17]. Při nedostatečném potažení ochranou

polymerní vrstvou, může dojít ke kontaktu obnažených magnetických jader nosičů s analyzovaným vzorkem a tím k ovlivnění výsledků analýzy. V případě nedokonalého odseparování použitých magnetických nosičů by mohlo dojít k negativnímu ovlivnění amplifikace DNA v PCR v důsledku přítomnosti iontů železa v PCR směsi.

Provedená stanovení ukázala, že většina z testovaných nosičů neinhibuje amplifikaci DNA. Lze tedy říci, že polymerní vrstva chránící kovová jádra je u testovaných nosičů dostatečná a zajišťuje tak ochranu před kontaktem s analyzovaným vzorkem. V případě polymerních magnetických nosičů byla jistá míra interference (v přítomnosti více než 10 μl nosičů (2 mg/ml) v PCR směsi o objemu 25 μl) prokázána u tří druhů nosičů Fkol 135 ox, Fkol B30 ox, C 103. Polymerní nosiče C 25 ovlivňovaly fluorescenční signál amplifikačních křivek v qPCR již od 0,5 μl nosičů (2 mg/ml) v PCR směsi (25 μl). Z důvodů možného ovlivnění výsledků PCR je proto u těchto nosičů nutné věnovat zvýšenou pozornost separaci použitých nosičů. Totéž platí pro všechny 3 testované komerční nosiče. Naproti tomu u nosičů Fkol 77ox, Fkol B100ox, Fkol B29ox, Fkol 46ox:2, C 9 a C 22 nebyla za daných experimentálních podmínek prokázána interference v PCR.

Manganaté nanonosiče peroskvit [51], [50] nijak neovlivňují amplifikaci DNA v qPCR až do množství 9 μl suspenze nosičů v PCR směsi. Testované termosenzitivní poly(N-isopropylacrylamidové) [39], [43] mikronosiče nevykazovaly v rámci testovaného množství nosičů (0,5 – 5 μl) v PCR směsi (25 μl) žádnou interferenci, jejich přítomnost neovlivňovala účinnost amplifikace DNA. Teoreticky tedy není u těchto nosičů nutné jejich odseparování před použitím eluované DNA jako DNA matrice při přípravě PCR směsi.

Výsledky uvedené v této kapitole byly částečně prezentovány v rámci přednášky Využití magnetických nanonosičů pro izolaci DNA z probiotických mléčných výrobků v průběhu VI. Symposia Společnosti pro probiotika a prebiotika. ČZU Praha (2010). Výsledky vztahující se k interferenci manganatého nosiče peroskvit v PCR byly publikovány ve rámci článku *Silica coated $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ nanoparticles for magnetically driven DNA isolation* v časopise *Journal of Separation Science* [50], který je uveden v příloze předkládané dizertační práce.

8 APLIKACE MAGNETICKÝCH NOSIČŮ PŘI IZOLACI DNA Z REÁLNÝCH VZORKŮ

V předchozích kapitolách bylo prokázáno, že metoda magnetické separace DNA v prostředí PEG 6000 a NaCl může být úspěšně použita na izolaci DNA v kvalitě vhodné pro PCR z bakteriálních buněk. Po optimalizaci podmínek magnetické separace byla u této části práce pozornost zaměřena na aplikaci vyvinuté metody na izolaci DNA z reálných vzorků, zejména z mléčných a probiotických výrobků, stolice myši a přípravků určený k čištění silně znečištěných povrchů (odlučovač tuků). Tyto výrobky představují matrice, které se vyznačují komplexním složením včetně obsahu inhibitorů, které mohou ovlivnit PCR.

Cílem práce byla izolace DNA s použitím magnetických nosičů s následnou identifikací bakteriální DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qPCR).

8.1 Využití magnetických nosičů při izolaci DNA z mléčných výrobků

Celkem bylo testováno 13 reálných komplexních vzorků (4 mléčné výrobky, 5 typů mléčných náhrad, 3 druhy probiotických doplňků stravy a 1 vaginální čípek) zakoupených v komerční síti (Tabulka 3). Bakteriální DNA byla izolována z hrubých lyzátů buněk připravených z uvedených reálných vzorků (1 g). Jako kontrolní metoda izolace DNA byla za shodných experimentálních byly použity komerční magnetické nosiče MPG[®] a metoda fenolové extrakce.

Za použití separační směsi č. 1 o složení 16% PEG 6000 a 2M NaCl v pomoci magnetických nosičů P(HEMA-co-PGMA) Fkol 135ox, komerčních magnetických nosičů MPG[®] byla ze všech reálných vzorků izolována DNA v dostatečném množství a čistotě.

Tabulka 19: Koncentrace a čistota DNA izolované z reálných vzorků pomocí magnetických nosičů P(HEMA-co-GMA), komerčních magnetických nosičů MPG[®] a fenolové extrakce.

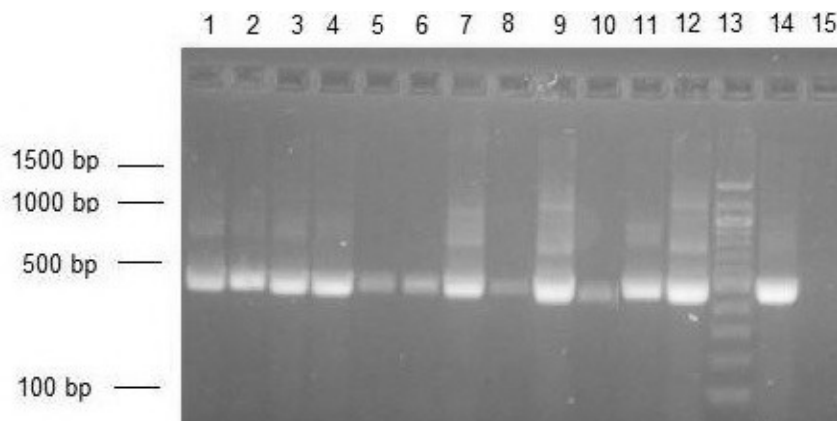
<i>Výrobek</i>	<i>Fenolová extrakce *</i>	<i>komerční nosiče **</i>	<i>Fkol 135ox **</i>
	<i>c (ng/μl)</i>	<i>MPG[®]</i> <i>c (ng/μl)</i>	<i>c (ng/μl)</i>
Activia příchuť lesní plody	399,0	44,6	26,8
Activia bílá	1870,	20,8	25,0
Zott bílý	249,0	26,5	21,0
Bílý jogurt z ovčího mléka, St. Pierre	181,0	11,9	21,3
Biopron Junior	706,0	8,5	42,0
Hipp 2 folgemilch	585,0	77,9	35,2
Beba premium	898,6	107,6	10,0
Nutrolin-B plus	615,7	227,2	51,0
Baby lactum	331,9	91,5	25,5
Gyntima [®] probiotica	316,0	10,0	42,0
Junior mléko BIFIDUS	125,0	30,5	10,5
Pangamin Bifi s inulinem	1310,0	107,4	30,3
Linex [®] forte	1750,0	141,5	60,3

* objem hrubého lyzátu buněk pro separaci byl 500 μl

** objem hrubého lyzázu buněk pro separaci byl 100 μl

Kvalita eluované DNA z reálných komplexních vzorků byla ověřena pomocí PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria* [103] a rod *Lactobacillus* [102].

Ve všech vzorcích byl detekován specifický produkt PCR o velikosti 466 bp (doména *Bacteria*), respektive 250 bp (rod *Lactobacillus*). Na základě intenzity PCR produktu lze usuzovat na množství DNA v PCR směsi. Rozdílná intenzita detekovaných amplikonů se shoduje s rozdílnou koncentrací DNA eluovaná z testovaných reálných vzorků (Obrázek 19). Množství a kvalita DNA odpovídala požadavkům amplifikace v PCR.



Obrázek 18: Gelová elektroforéza produktu PCR (466 bp) specifického pro doménu *Bacteria* [103].

DNA izolované z komplexních vzorků metodou magnetické separace (magnetické nosiče P(HEMA-co-GMA) v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl.

Běh (1) Activia, příchuť lesní plody, (2) Activia bílá, (3) Zott bílý, (4) Bílý jogurt z ovčího mléka, St. Pierre, (5) Beba premium, (6) Baby Lactum, (7) Hipp 2 folgemilch, (8) Gyntima[®] probiotica, (9) Biopron Junior, (10) Junior mléko BIFIDUS, (11) Pangamin Bifi s inulinem, (12) Linex[®] forte (13) žebříček 100 bp, (14) pozitivní kontrola DNA *Lactobacillus gasseri* K7 10 ng/μl, (15) negativní kontrola.

Kvantifikace DNA izolované pomocí magnetických nosičů z testovaných mléčných výrobků byla provedena pomocí PCR v reálném čase za využití primerů specifických pro doménu *Bacteria* [103] a rod *Lactobacillus* [102]. Kvantifikace byla provedena metodou absolutní kvantifikace na základě kalibrační křivky (rozsah 100 ng/μl – 1 pg/μl) sestavené za použití DNA *Lactobacillus gasseri* K7. Statistické vyhodnocení získaných výsledků bylo provedeno pomocí Software Rotorgene 6000 cycler (verze 1. 7. 87). Výsledky kvantifikace jsou pro testované vzorky souhrně uvedeny v Tabulce 20.

Tabulka 20: Kvantifikace DNA izolované z komplexních vzorků metodou magnetické separace (magnetické nosiče P(HEMA-co-GMA)). PCR v reálném čase specifická pro rod *Lactobacillus* [102].

<i>Výrobek</i>	<i>Ct</i>	<i>DNA Lactobacillus (ng/PCR směs)</i>	<i>Počet bakt. buněk (x10⁶) / 1 g výrobku</i>
Activia příchut' lesní plody	16,39	0,19	0,95
Activia bílá	16,40	0,23	1,15
Zott bílý	16,03	0,32	1,60
Bílý jogurt z ovčího mléka	16,42	0,27	1,30
Beba premium	16,74	0,21	1,05
Baby lactum	16,45	0,24	1,12
Hipp 2 folgemilch	16,69	0,20	1,02
Junior mléko BIFIDUS	n	0,00	n
Biopron Junior	16,48	0,24	1,18
Gyntima [®] probiotica	n	n	n
Pangamin Bifi s inulinem	16,06	0,27	1,56
Linex [®] forte	15,57	0,52	2,18

n - nedetekováno

8.1.1 Diskuze

Výsledky potvrzují, že metoda magnetické separace za využití magnetických polymerních nosičů P(HEMA-co-GMA) (Fkol 135 ox) je vhodná pro izolaci DNA z komplexních vzorků. Získaná DNA neobsahuje inhibitory PCR reakce. Kvantifikované množství DNA je řádově shodné s očekávaným nebo přímo výrobcí deklarovaným množstvím celkové bakteriální DNA.

Vybrané výsledky byly publikovány v časopise Mlékařské listy (ročník 22, č. 126, 2011) v článku *Izolace DNA z mléčných a probiotických výrobků pomocí magnetických mikronosičů*. Článek je v celém rozsahu uveden v příloze dizertační práce.

8.2 Využití magnetických nosičů při izolaci DNA ze stolice myši

Metoda magnetické separace byla použita pro izolaci DNA ze vzorků myši stolice obohacené o probiotický kmen *Lactobacillus gasseri* K7 izolovaný, ze stolice kojenců. Magnetická separace DNA byla provedena za použití magnetického polymerního nosiče P(HEMA-co-GMA) (Fkol 77ox) (Tabulka 2). Množství a kvalita DNA byla ověřena konvenční PCR a PCR v reálném čase (primery specifické pro rod *Lactobacillus* [102] a pro gen kódující produkci bakteriocinu gassericinu K7 produkovaného bakteriemi *Lactobacillus gasseri* K7 [105]). Pro kontrolu účinnosti izolace DNA, byly dále použity dva druhy komerčně dostupných kitů a metoda fenolové extrakce. Z hrubých lyzátů buněk připravených ze vzorků myši stolice byla izolována celková DNA pomocí magnetických mikronosičů P (HEMA-co-GMA) a komerčně dostupných kitů (Quiagen a Maxwell) a metodou fenolové extrakce.

8.2.1 Izolace DNA ze vzorků stolice myši

Reversibilní vazba DNA z hrubých lyzátů buněk (objem v separační směsi 200 µl) na nosič P(HEMA-co-GMA) o koncentraci 2 mg/ml (100 µl v separační směsi) byla provedena v prostředí 2,0 M NaCl a 16% PEG 6000 za laboratorní teploty. Celkový objem separační směsi byl 1000 µl.

DNA adsorbovaná na magnetické nosiče byla eluována (15 min.) do 200 µl TE pufru o pH 7,8 za laboratorní teploty. Koncentrace a čistota DNA byla ověřena spektrofotometricky, výsledky porovnávající výtěžnost v závislosti na použité metodě izolace jsou shrnuty v Tabulce 21.

Tabulka 21: Koncentrace a čistota DNA izolované z myší stolice testovanými metodami.

<i>Metoda izolace</i>	<i>HL buněk (ml)</i>	<i>DNA izolovaná ze stolice myší</i>	
		<i>(ng/µl)</i>	<i>(A_{260nm}/A_{280nm})</i>
Fenolová extrakce	1,0	70,0	1,66
P(HEMA- <i>co</i> -GMA) **	0,2 *	10,0	1,41
QIAamp DNA Stool Mini Kit	1,2	40,0	1,79
Maxwell16 Cell DNA Purification Kit	1,0	90,0	1,75

* DNA izolována z 200 µl

** P(HEMA-*co*-GMA) nosiče (obsah -COOH 0,764 mM/g)

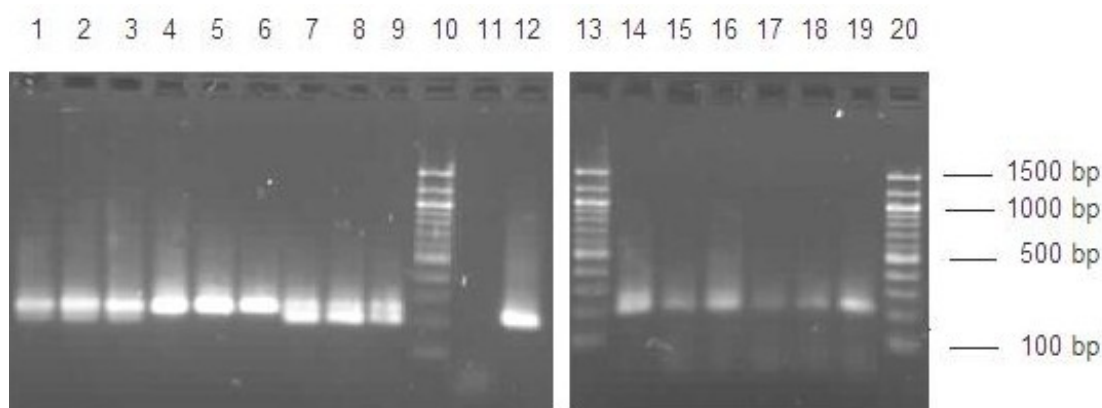
HL hrubý lyzát buněk

Za daných experimentálních podmínek byla nejvyšší koncentrace DNA získána za použití komerčního kitu Maxwell®. Nejnižší koncentrace DNA byla izolována pomocí magnetických polymerních nosičů P(HEMA-*co*-GMA) (obsah -COOH 0,764 mM/g). Koncentrace uvedená v tabulce byla získána přepočtem, kdy bylo vzato v úvahu, že byl použit nižší objem hrubého lyzátu buněk než v případě ostatních metod (v porovnání s ostatními metodami to bylo pouze 200 µl).

8.2.2 Amplifikace DNA a detekce PCR produktů

8.2.2.1 Konvenční polymerázová řetězová reakce

Kvalita a množství izolované DNA byla potvrzena amplifikací v PCR za použití specifických primerů pro rod *Lactobacillus* [102]. Gelovou elektroforézou bylo potvrzeno, že všemi metodami byla izolována DNA *Lactobacillus* (250 bp) v kvalitě vhodné pro PCR (Obrázek 19). Intenzita PCR produktů (250 bp) odráží množství DNA v PCR směsi.

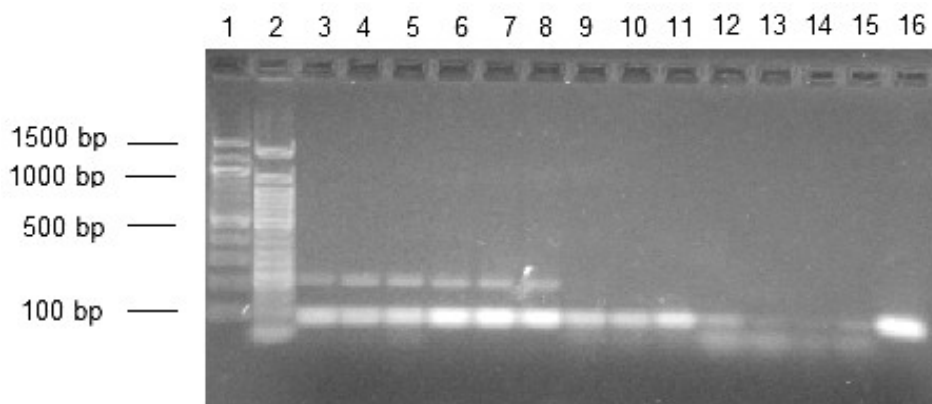


Obrázek 19: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) specifických pro rod *Lactobacillus*.

Do směsi pro PCR o celkovém objemu 25 µl byl použit 1 µl DNA.

Běh (1-3) Maxwell 16 Cell DNA purifikační kit, (4-6) QIAamp DNA Stool Mini Kit, (7-9) metoda fenolové extrakce, (10) žebříček 100 bp, (11) negativní kontrola, (12) pozitivní kontrola – DNA *Lactobacillus gasseri* K7, 10 ng/µl, (13) žebříček 100 bp, (14-16) metoda magnetické separace pomocí P(HEMA-*co*-GMA) nosiče, (20) žebříček 100 bp.

Přítomnost bakteriálního kmene *Lactobacillus gasseri* K7 byla potvrzena u všech vzorků pomocí amplifikace DNA v PCR za použití primerů specifických pro bakteriocin gassericin K7 LFA 185 a LFA 268 [105] produkovaným tímto kmenem (Obrázek 20).



Obrázek 20: Agarosová gelová elektroforéza produktu PCR (84 bp) specifického pro bakteriocin gassericin K7 produkovaný kmenem *Lactobacillus gasseri* K7.

Do směsi pro PCR o celkovém objemu 25 μ l byl použit 1 μ l DNA.

Běh (1) žebříček 100 bp, (2) žebříček 50 bp, (3-5) metoda fenolové extrakce, (6-8) Maxwell 16 Cell DNA purifikační kit, (9-11) QIAamp DNA Stool Mini Kit, (12-15) metoda magnetické separace pomocí P(HEMA-co-GMA) nosičů, (16) pozitivní kontrola – DNA *Lactobacillus gasseri* K7, 10 ng/ μ l.

Intenzita PCR produktů (84 bp) odráží různá množství eluované DNA v PCR směsi. Nejslabší byla u amplikonů z DNA purifikované metodou magnetické separace pomocí nosiče P(HEMA-co-GMA). Přítomnost nespecifických PCR produktů (200 bp) po amplifikaci DNA pomocí primerů specifických pro bakteriocin gassericin K7 byla detekována u DNA izolované komerčně dostupným kitem pro izolaci DNA Maxwell 16 Cell DNA purifikační kit a u DNA izolované metodou fenolové extrakce [2]. Přítomnost nespecifických PCR produktů je pravděpodobně způsobena v důsledku vysoké koncentrace DNA v PCR směsi (Tabulka 21). Použité podmínky PCR reakce byly optimalizovány na nižší koncentraci DNA v PCR směsi.

8.2.2.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

PCR v reálném čase (qPCR) pomocí primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102] byla použita pro zhodnocení účinnosti amplifikace DNA izolované různými metodami z myší stolice.

Metoda qPCR je velmi citlivou metodou, zejména na přítomnost inhibitorů v analyzovaném vzorku, jejichž působení v závislosti na koncentraci způsobuje pokles účinnosti amplifikace. Vyhodnocení je prováděno na základě hodnot směrnice amplifikačních křivek (M), korelačního koeficientu (R^2) a reakční účinnosti (r.e.).

Výsledky kvantifikace v PCR v reálném čase byly vyhodnoceny pomocí lineární regresní analýzy, hodnoty reakční účinnosti (r.e.) byly vypočteny na základě Rovnice 4 uvedené v kapitole 3.1.2.1. Výsledky porovnání účinnosti kvantifikace v PCR v reálném čase jsou shrnuty v Tabulce 22.

Tabulka 22: Vliv metody extrakce DNA z myší stolice na účinnost amplifikace DNA v PCR v reálném čase za použití fluorescenčního barviva SYBR Green (lineární regresní analýza).

<i>Metoda izolace</i>	<i>c DNA (ng/μl)</i>	<i>M</i>	<i>r.e.</i>	<i>R₂</i>	<i>k.v. (%)</i>
fenolová extrakce	0,021 – 21,0	- 3,183	1,06	0,9994	3,5 – 8,3
nosiče P(HEMA-co-GMA) *	0,05 – 50,0	-3,447	0,95	0,9933	1,6 – 8,4
QIAamp DNA Stool Mini Kit	0,09 – 90,0	- 3,071	1,10	0,9998	3,1 – 4,4

R² - korelační koeficient, M - směrnice amplifikačních křivek, r.e. - reakční účinnost,

k.v. - variační koeficient (relativní směrodatná odchylka)

*P(HEMA-co-GMA) nosiče (obsah -COOH 0,764 mM/g)

Reakční účinnost (r.e.) a sklon amplifikačních křivek (M) neprokázala zněčištění vzorků inhibitory PCR reakce. Analýza křivek tání PCR produktů potvrdila specifitu všech získaných PCR produktů. Byl detekován jeden vrchol na křivkách tání o teplotě tání $T_m = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$, což potvrzuje, že byl detekován pouze specifický PCR produkt. Robustnost metody, která je určena korelačním koeficientem lineární regrese (R^2) je pro všechny testované metody v optimálním rozsahu a výsledky kvatifikace lze považovat za spolehlivé.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že metoda real-time PCR umožňuje přesnější analýzu přítomnosti inhibitorů PCR v DNA analyzovaných vzorků než konvenční PCR s následnou gelovou elektroforézou.

8.2.3 Diskuze

Byla prokázána možnost využití magnetických polymerních částic P(HEMA-co-GMA) pro izolaci DNA z hrubých lyzátů buněk připravených ze vzorků stolice myší. Tyto vzorky jsou řazeny mezi komplexní matrice, obsahující řadu látek, které mohou inhibovat amplifikaci DNA v PCR [1], [11], [69], proto jsou na metody izolace DNA kladeny vysoké nároky.

DNA byla ze vzorků izolována metodou magnetické separace, fenolové extrakce a dvou typů komerčních kitů pro izolaci DNA. Za daných experimentálních podmínek byla nejvyšší koncentrace DNA získána za použití komerčního kitu Maxwell[®]. Pomocí metody magnetické separace za využití magnetických nosičů P(HEMA-co-GMA) (obsah -COOH 0,764 mM/g) byla izolována DNA v kvalitě a množství vhodném pro konvenční PCR i PCR v reálném čase (qPCR).

Porovnáním výsledků gelové elektroforézy PCR produktů a výsledků PCR v reálném čase bylo ověřeno, že metoda real-time PCR umožňuje přesnější analýzu přítomnosti inhibitorů PCR v DNA analyzovaných vzorků.

Uvedené výsledky byly získány v průběhu zahraniční stáže v rámci programu Erasmus na Universitě v Ljublaně, Biotechnologické fakultě, oddělení Zootechniky v Domžale (prof. Ireny Rogejl). Publikovány byly ve formě plakátového sdělení v rámci XIII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Masarykova univerzita, Brno (2009) a na mezinárodních konferencích International XXXII Congress of the Society of Microbial Ecology and Disease (SOMED) 2009, Petřohrad, Rusko, 3rd Congress of European Microbiologists (FEMS) 2009, Gothenburg, Švédsko, 4th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis (RAFA) 2010, Praha, ČR. Ve formě vědeckého článku byly zaslány k publikaci do *Molecular Crystals and Liquid Crystals*.

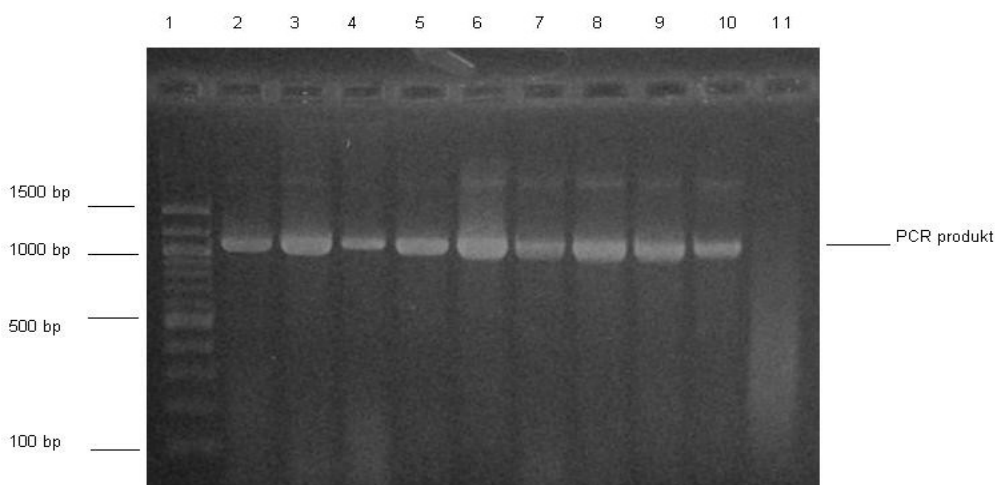
8.3 Využití magnetických nosičů při analýze DNA bakterií rodu *Bacillus*

Cílem studie bylo vyvinout rychlou metodu izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR a další molekulárně diagnostické metody z reálných vzorků obsahujících možné inhibitory PCR. Technika magnetické separace v kombinaci s konvenční PCR s následnou detekcí metodou restriční analýzy amplifikované ribozomální DNA (amplified ribosomal DNA restriction analysis – ARDRA) byla použita k identifikaci druhů rodu *Bacillus* v komerčně dodávaném výrobku (SanyDuo) určeném pro biodegradaci tuků v průmyslových separátorech. Součástí výrobku SanyDuo jsou aerobní i anaerobní bakterie, převážně gramnegativní tyčinky a koky, včetně bakteriální spor [100].

Jako referenční vzorky byly použity bakteriální kmeny získané z České sbírky mikroorganismů (CCM, Brno, ČR) *Bacillus subtilis* CCM 1999, *Bacillus cereus* CCM 2010^T, *Bacillus licheniformis* CCM 2145^T, *Bacillus circulans* CCM 1611, *Bacillus. megaterium* CCM 2037, *Bacillus mycoides* CCM 915 a *Bacillus thuringiensis* CCM 19^T.

Z hrubých lyzátů buněk kontrolních bakteriálních kmenů byla metodou magnetické separace pomocí magnetického nosiče P(HEMA-co-GMA) (obsah -COOH 0,764 mM/g) v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl izolována DNA (pořadí komponent odpovídá separační směsi č. 1 (Tabulka 2), eluce do 100 µl TE pufru o pH 7,8 při laboratorní teplotě po dobu 30 min). Koncentrace a čistota izolované DNA byla ověřena spektrofotometricky.

Kvalita extrahované DNA byla potvrzena konvenční PCR a PCR v reálném čase za využití primerů specifických pro doménu *Bacteria* [104] a rod *Bacillus* [106] (Obrázek 21).



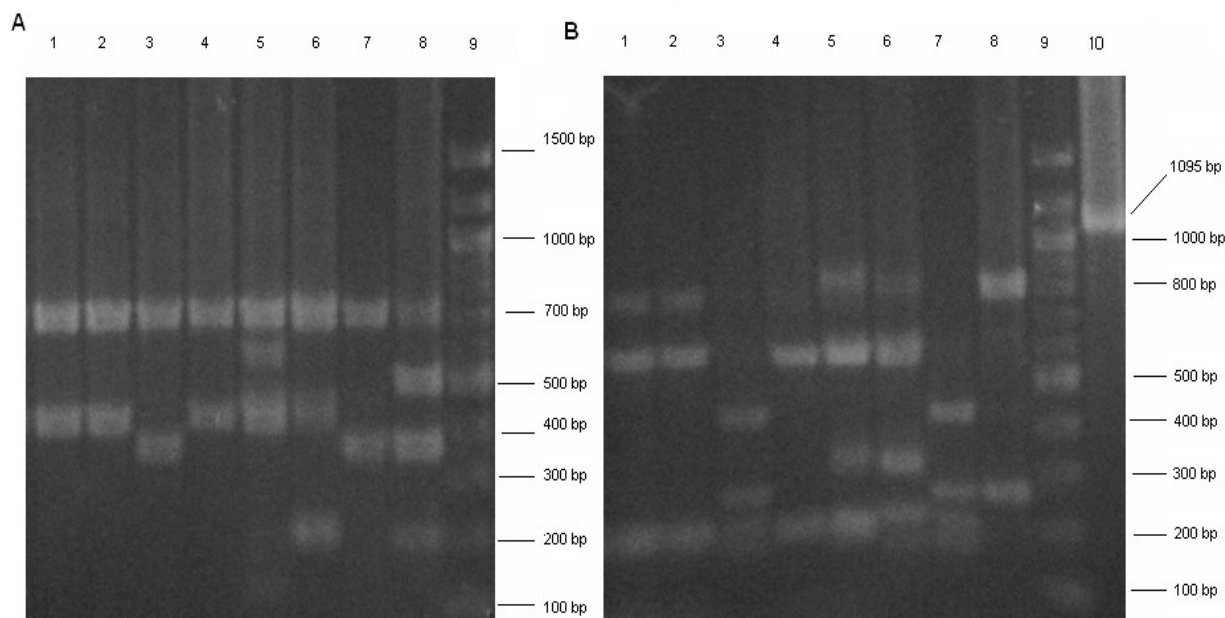
Obrázek 21: Agarosová gelová elektroforéza produktu PCR (1095 bp) při použití primerů specifických pro rod *Bacillus* [106].

Běh (1): žebříček 100 bp, (2) *B. cereus* CCM 2010^T, (3) *B. subtilis* CCM 1999, (4) *B. licheniformis* CCM 2145^T, (5) *B. circulans* CCM 1611, (6) *B. megaterium* CCM 2037, (7) *B. mycoides* CCM 915, (8) *B. thuringiensis* CCM 19^T, (9) testovaný vzorek (přípravek SanyDuo), (10) pozitivní kontrola *B. subtilis* CCM 1999 (10 ng/µl), (11) negativní kontrola.

Metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase (primery specifické pro rod *Bacillus*) byly ověřeny výsledky spektrofotometrického stanovení koncentrace izolované DNA. Data byla zpracována metodou regresní analýzy na základě kalibrační křivky setrojené z purifikované DNA *Bacillus cereus* o rozsahu koncentrací 150 ng/µl až 1,5 pg/µl v PCR směsi. Na základě analýzy teploty tání PCR produktů byly potvrzeny výsledky gelové elektroforézy PCR produktů konvenční PCR.

PCR produkty (1039 bp) získané po amplifikaci za použití rodově specifických primerů [89] byly přečištěny za použití magnetického polymerního nosiče P(HEMA-*co*-GMA) (Fkol 77ox) v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl (separační směs č. 1 (Tabulka 4), eluce do 50 µl TE pufru o pH 7,8 při LT po dobu 30 min.) a podrobeny štěpení pomocí restrikčních endonukleas *AluI* a *TaqI*.

Restrikční profil získaný po působení restrikčních endonukleas z *TaqI* a *AluI* na PCR produkty referenčních kmenů (1095 bp) jsou uvedeny na Obrázku 22. Profily byly porovnány s odpovídajícími sekvencemi dostupnými v databázi GenBank [106].



Obrázek 22: Restrikční fragmenty PCR ampliconů referenčních kmenů *Bacillus* [106] (velikost ampliconu 1095 bp) po působení endonukleas *AluI* (snímek A) a *TaqI* (snímek B).

Běh (1) *B. cereus* CCM 2010^T, (2) *B. subtilis* CCM 1999, (3) *B. licheniformis* CCM 2145^T, (4) *B. circulans* CCM 1611, (5) *B. megaterium* CCM 2037, (6) *B. mycoides* CCM 915, (7) *B. thuringensis* CCM 19T, (8) testovaný vzorek (přípravek SanyDuo), (9) žebříček 100 bp, (10) neštěpený PCR produkt *B. subtilis* CCM 1999 (10 ng/µl).

Kultivací bakteriálních buněk obsažených v testovaném reálném výrobku SanyDuo na Petriho miskách byly získány kolonie bakteriálních buněk, které byly přečištěny křížovým roztěrem a použity jako DNA matrice do PCR. Výsledky konvenční PCR s použitím primerů specifických pro rod *Bacillus* [103] potvrdily, že bakteriální buňky tvořící tyto kolonie patří do rodu *Bacillus*. Identifikace na úrovni druhu byla provedena metodou ARDRA působením restrikčních enzymů *AluI* a *TaqI* dle postupu uvedeného výše. Porovnání získaných výsledků vedlo k závěru, že v testovaném výrobku (SanyDuo) jsou obsaženy bakteriální buňky *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis*.

8.3.1 Diskuze

Na základě provedeného stanovení a porovnání s dostupnými daty byly v testovaném výrobku SanyDuo navrženém pro použití v odlučovačích tuku identifikovány dva bakteriální rody, a to *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis*, které se vyznačují produkcí lypolityckých enzymů. Testovaný výrobek SanyDuo představuje vysoce komplexní matici viskózního charakteru.

DNA izolovaná z komplexních vzorků magnetickými nosiči P(HEMA-*co*-GMA) byla získána v kvalitě a množství vhodném pro PCR. Následně bylo ověřeno, že tato metoda je vhodná i pro

purifikaci PCR produktů před aplikací restrikčních enzymů metodou ARDRA. Výsledky práce bylo potvrzeno, že metodou reversibilní imobilizace nukleových kyselin na pevných nosičích lze izolovat kvalitní DNA, která je vhodná i v případě zpracování reálných komplexních vzorků, které se vyznačují přítomností inhibitorů a jiných kontaminujících látek.

Výsledky byly publikovány ve formě plakátových sdělení na Mezinárodní probiotické a prebiotické konferenci (IPC) Košice, SR (2010), a článku prezentovaném ve sborníku příspěvků v rámci 5th Central European Congress on Food 2010 Bratislava, SR: *PCR identification of Bacillus strains from a complex sample*, (2010), který je v plném rozsahu uveden v příloze dizertační práce.

9 REVERSIBILNÍ ADSORPCE DNA NA NOSIČE PEROSKVIT

V dříve publikovaných pracích [62], [108] byly pro izolaci nukleových kyselin z různých typů vzorků obsahujících řadu inhibitorů úspěšně použity magnetické nosiče na bázi silikagelu (oxid křemičitý) označované jako magnetické sklo. Na základě podobných vlastností nanonosičů manganátého peroskvitu $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$, které jsou potaženy vrstvou oxidu křemičitého lze předpokládat, že jsou také vhodné pro izolaci nukleových kyselin.

Cílem práce bylo ověřit možnost použití nosičů peroskvit pro izolaci DNA z různých typů vzorků (hrubé lžáty buněk, probiotické mléčné výrobky a doplňky stravy). Byly testovány shodné podmínky izolace DNA jako při použití polymerních magnetických nosičů. Předpokládaný mechanismus vazby DNA molekul na povrch nosiče využívá vodíkových vazeb prostřednictvím hydrofilních SiO^- skupin tvořících povrch nosičů.

9.1 Optimalizace metody

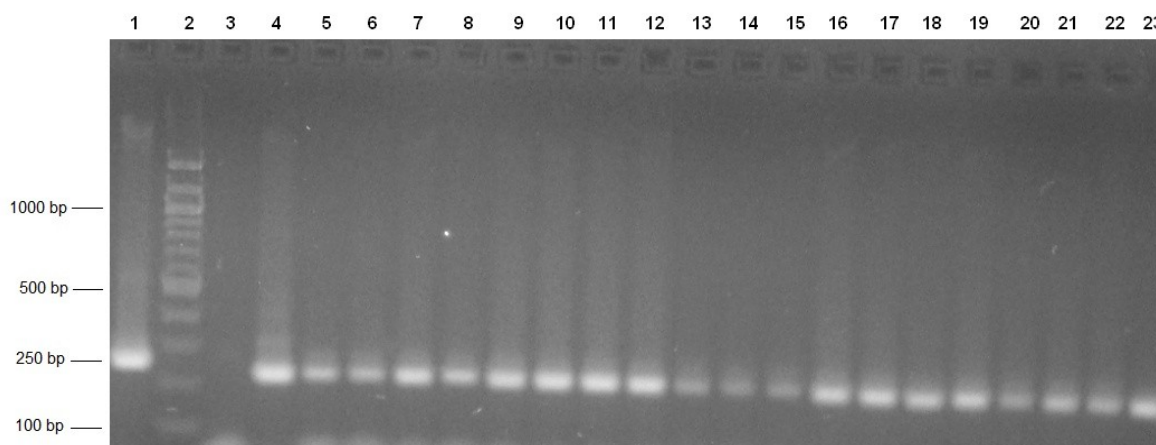
Optimalizace podmínek reverzibilní adsorpce DNA byla prováděna v prostředí dvoufázového vodného systému obsahujícího různé množství PEG 6000 a NaCl s použitím purifikované DNA *Lactobacillus gasser* K7 (200 ng/μl). Pozornost byla věnována také konečné koncentraci NaCl v separační směsi a pořadí komponent separační směsi. Experimentální podmínky a testované separační směsi o různé kombinaci jednotlivých komponent jsou uvedeny v kapitole 5.4.4.3 v Tabulce 5. Jako kontrolní metoda izolace DNA byla použita metoda fenolové extrakce a komerční MPG[®] částice (magnetické sklo). Byly použity separační směsi č. 1 až 10 o složení uvedeném v Tabulce 5. Koncentrace DNA v eluátech byla stanovena spektrofotometricky a potvrzena metodou qPCR (Tabulka 19). Na základě stanovení koncentrace izolované DNA byla jako nejvhodnější zvolena separační směs č. 1 (Tabulka 5). Složení této směsi ve smyslu pořadí jednotlivých komponent je shodné s pořadím nejvhodnějším pro izolaci nukleových kyselin za využití magnetických polymerních nosičů P(HEMA-co-GMA). Výsledky také potvrdily, že v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl byla získána DNA ve vyšší koncentraci než tomu bylo při použití 8% koncentrace PEG 6000 v separační směsi.

Kvalita, amplifikovatelnost a kvantifikace DNA izolované nosiči peroskvit byla provedena pomocí PCR a qPCR. Pro PCR (qPCR) byly použity primery specifické pro doménu *Bacteria* [103] a primery specifické pro rod *Lactobacillus* [102]. Na základě stanovení teploty tání ampliconů byla potvrzena specifita produktů PCR. Specifická teplota tání ampliconů za použití primerů specifických pro rod *Lactobacillus* je 86 °C, v případě primerů specifických pro doménu *Bacteria* 90 °C. Následnou gelovou elektroforézou byly potvrzeny výsledky analýzy křivek tání – byl detekován specifický PCR produkt o velikosti 250 bp (*Lactobacillus*) a 466 bp (doména *Bacteria*). Souhrnné výsledky účinnosti separace DNA jsou uvedeny v Tabulce 19.

Tabulka 19: Optimalizace separační směsi při izolaci DNA za použití nosičů peroskvit. Kvantifikace DNA metodou qPCR s využitím primerů specifických pro doménu *Bacteria* [103].

<i>Separační směs</i>	<i>PEG 6000 (%)</i>	<i>DNA (ng/μl)</i>	<i>DNA v PCR směsi (ng/ 25 μl)</i>	<i>Ct</i>	<i>DNA v qPCR směsi (ng/25 μl)</i>
1	8	22,4	0,90	19,82	0,81
2		22,7	0,91	19,82	0,86
3		17,7	0,71	20,19	0,72
4		32,0	1,28	20,09	0,74
5		21,0	0,84	19,89	0,77
6		17,4	0,70	20,70	0,60
7		26,7	1,07	19,20	0,91
8		21,2	0,85	20,36	0,71
9		18,7	0,75	21,31	0,40
10		27,0	1,08	19,95	0,74
1	16	55,3	2,21	18,74	2,07
2		35,5	1,41	19,07	1,10
3		30,5	1,22	20,42	0,61
4		36,4	1,46	19,17	0,92
5		28,5	1,14	19,08	1,05
6		36,3	1,45	19,15	1,01
7		28,2	1,13	19,48	0,91
8		29,7	1,19	19,16	0,93
9		29,1	1,16	20,89	0,54
10		35,0	1,81	18,93	1,11

V závislosti na výchozí koncentraci DNA, kdy je toto množství DNA bráno, jako 100% byla určena separační účinnost magnetických nosičů. Za daných experimentálních podmínek se separační účinnosti pohybovaly dle použité separační směsi od 17 do 55 %.



Obrázek 23: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR (250 bp) získaných za využití primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102].

Běh (1) pozitivní kontrola DNA *Lactobacillus* ($c = 35 \text{ ng/ } \mu\text{l}$), (2) žebříček 100 bp, (3) negativní kontrola, (4-13) separační směs 1-10 (16% PEG 6000 a 2M NaCl), (14-23) separační směs 1-10 (8% PEG 6000 a 2M NaCl).

Dále byl testován vliv koncentrace NaCl (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 a 2,5 M) v kombinaci s 8% a 16% PEG 6000 na účinnost separace purifikované DNA (Tabulka 20). Kvantifikace byla provedena v qPCR za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria* [103] metodou absolutní kalibrace ($R^2 = 0,994$, $M = -3,493$, r.u. = 0,93, v.c. = 9,7 – 39,1 %) byla ověřena koncentrace eluované DNA. Specifita PCR produktů byla potvrzena analýzou křivek tání ($T_m = 90,5\text{ }^\circ\text{C}$) a gelovou elektroforézou (velikost PCR produktu 466 bp).

Tabulka 20: Účinnost separace DNA pomocí nosičů peroskvitu za různých koncentrací PEG 6000 a NaCl v separační směsi.

<i>NaCl</i> (mol/l)	<i>PEG 6000</i> (%)	<i>DNA</i> (ng/μl)	<i>DNA v PCRsměsi</i> (ng/25 μl)	<i>Ct</i>	<i>DNA v qPCR směsi</i> (ng/25 μl)
0,5	8	6,0	0,24	16,80	0,13
1,0		7,0	0,28	16,66	0,20
1,5		22,0	0,88	15,54	0,76
2,0		27,8	1,11	15,52	0,77
2,5		32,5	1,95	14,95	1,04
0,5	16	19,5	0,78	15,84	0,61
1,0		20,8	0,83	15,27	0,83
1,5		29,3	1,17	14,88	1,01
2,0		40,5	1,62	14,76	1,19

Výsledky spektrofotometrického měření i kvantifikace v PCR se přibližně shodují s výše uvedenými závěry. Jestliže výchozí množství DNA v separační směsi (chromozomální DNA *Salmonella* o koncentraci 200 ng/μl ($A_{260\text{nm}/280\text{nm}} = 1,95$)) je považováno za 100%, tak účinnost separace DNA u testovaných nosičů byla v případě použití kombinace 2M NaCl, 16% PEG 6000 40,5 % a 2M NaCl, 8% PEG 6000 32,5 %. Provedená stanovení potvrzují předchozí závěry, že nejvhodnější podmínky pro separaci DNA magnetickými nosiči peroskvit jsou dosaženy v přítomnosti 16%PEG 6000 a 2M NaCl (Tabulka 20).

9.2 Izolace DNA nosiči peroskvitu z mléčných výrobků

Magnetické nosiče peroskvit byly za optimalizovaných podmínek použity pro izolaci DNA z hrubých lyzátů buněk reálných (komplexních) vzorků (Tabulka 3). Izolace DNA byla provedena pomocí separační směsi o složení 16% PEG 6000 a 2M NaCl. Eluovaná DNA byla následně použita jako matrice do PCR a qPCR za využití primerů specifických pro doménu *Bacteria* [103]. Celkem bylo testováno 13 reálných komplexních vzorků (4 mléčné výrobky, 5 typů mléčných náhrad, 3 druhy probiotických doplňků stravy a 1 gynekologický preparát).

Jako kontrola byla použita izolace DNA z hrubých lyzátů buněk pomocí fenolové extrakce a komerčně dodávaných magnetických nosičů MPG[®] uncoated (MCPG0510) za shodných experimentálních podmínek (tj. v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl).

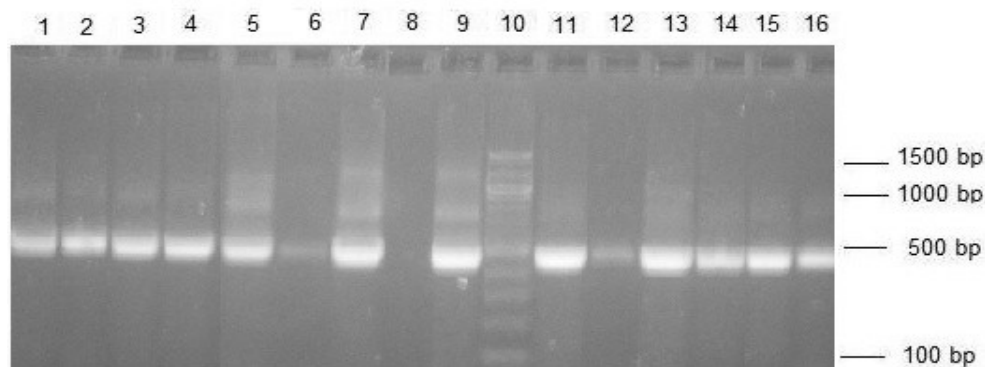
Tabulka 23: Izolace DNA z reálných vzorků metodou magnetické separace (různá koncentrace PEG 6000 v separační směsi), komerčních magnetických nosičů MPG® a metodou fenolové extrakce.

<i>Testované výrobky</i>	<i>Fenolová extrakce*</i>	<i>komerční nosiče**</i>	<i>Peroskvit**</i>	
		<i>MPG®</i>		
		<i>16% PEG 6000, 2M NaCl</i>	<i>8% PEG 6000, 2M NaCl</i>	<i>16% PEG 6000, 2M NaCl</i>
	<i>c(ng/μl)</i>	<i>c (ng/μl)</i>	<i>c(ng/μl)</i>	<i>c(ng/μl)</i>
Activia, příchut' lesní plody	399,0	44,6	10,8	26,8
Activia bílá	187,0	20,8	18,0	25,0
Zott bílý	249,0	26,5	22,1	21,0
Bílý jogurt z ovčího mléka	181,0	11,9	-	21,3
Biopron Junior	706,0	8,5	13,2	142,0
Hipp 2 folgemilch	585,0	77,9	24,7	122,0
Beba premium	898,6	107,6	29,9	10,0
Nutrolin-B plus	615,7	227,2	38,0	45,6
Baby lactum	331,9	91,5	18,8	25,5
Gyntima® probiotica	316,0	10,0	4,2	8,7
Junior mléko BIFIDUS	125,0	30,5	10,3	71,2
Pangamin Bifi s inulinem	1310,0	107,4	13,8	30,3
Linex® forte	1750,0	141,5	47,7	135,6

* objem hrubého lyzátu buněk pro separaci byl 500 μl

** objem hrubého lyzázu buněk pro separaci byl 100 μl

Metodou magnetické separace pomocí nosičů peroskvit a metodou fenolové extrakce byla z reálných vzorků izolována DNA v dostatečném množství a čistotě (Tabulka 23). Po amplifikaci (DNA byla 10x zředěna) byly ve všech vzorcích detekovány specifické produkty PCR o velikosti 466 bp (Obrázek 24). Intenzity produktů PCR odpovídaly množství DNA ve směsi PCR (s výjimkou výrobku Biopron Junior).



Obrázek 24: Agarosová gelová elektroforéza produktu PCR (doména *Bacteria* - 466 bp), DNA izolována pomocí nanonosičů LSMO(0,25)@SiO₂ z komplexních vzorků v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl.

Běh (1) Zott bílý, (2) Activia, příchut' lesní plody, (3) Activia bílá, (4) Hipp 2 folgemilch, (5) Nutrolin-B plus, (6) Biopron Junior, (7) Baby lactum, (8) negativní kontrola, (9) pozitivní kontrola *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 216/06 – 35 ng/μl, (10) žebříček 100 bp, (11) Beba premium, (12) Gyntima® probiotica, (13) Linex® Forte, (14) Junior mléko BIFIDUS, (15) Pangamin Bifi s inulinem, (16) Bílý jogurt z ovčího mléka.

Pro kvantifikaci izolované DNA metodou qPCR byla použita metoda absolutní kvantifikace, využívající kalibrační křivku, ze které bylo přímo odečítáno množství DNA v analyzovaných vzorcích. Pro sestavení kalibrační křivky byla použita purifikovaná DNA bakteriálního kmene *Lactobacillus gasseri* K7. Kalibrační řada obsahovala DNA v množství 100 ng/μl, 10 ng/μl, 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl a 1 pg/μl.

Tabulka 24: Vyhodnocení výsledků kvantifikace DNA izolované z komplexních vzorků metodou magnetické separace v qPCR (doména *Bacteria* [103]).

Testované výrobky	DNA v PCR směsi (ng/25 μl)	Hodnota Ct	DNA v qPCR směsi (ng/25 μl)	Počet bakt. buněk ($\times 10^8$) / 1 g výrobku
Activia, příchut' lesní plody	1,1	18,76	0,9	4,5
Activia bílá	1,0	18,98	0,6	3,0
Zott bílý	0,8	17,86	0,4	2,0
Bílý jogurt z ovčího mléka	0,9	17,57	0,5	2,5
Biopron Junior	5,7	13,40	5,4	27
Hipp 2 folgemilch	4,9	18,86	4,0	20
Beba premium	0,4	18,13	0,1	0,5
Nutrolin-B plus	n	n	n	n
Baby lactum	1,0	19,41	0,9	4,5
Gyntima® probiotica	0,3	19,27	0,3	1,5
Junior mléko BIFIDUS	2,8	20,13	2,4	12
Pangamin Bifi s inulinem	1,2	18,68	1,2	6
Linex® forte	5,4	14,29	5,0	25

n - nedetekováno

Dle stanovené koncentrace DNA byl vypočten počet bakteriálních buněk/1 g výrobku. Pohyboval se v rozmezí $0,5 \cdot 10^8$ až $2,7 \cdot 10^9$ buněk/1 g výrobku. Navržená metoda izolace DNA testovanými částicemi je vhodná pro kvantifikaci buněk cílových mikroorganismů.

9.3 Diskuze

Magnetické nosiče manganatého peroskvitu se oproti ostatním testovaným nosičům vyznačují specifickými vlastnostmi - vzájemná interakce SiO^- na povrchu nosičů pokrytých vrstvou silikagelu zajišťuje vysokou stabilitu nosičů v suspenzi, v důsledku čehož nedochází k jejich sedimentaci [50], [51]. Tato vysoká koloidní stabilita umožňuje ve srovnání s jinými magnetickými nosiči přesnější dávkování a tedy vysokou reprodukovatelnost DNA izolace. Dále se vyznačují vysokou magnetizací, která urychluje separaci nosičů a zároveň slabou zbytkovou magnetizací omezující tendenci k aglomeraci nosičů po odstranění magnetického pole [50], [51]. S ohledem na podmínky separace a charakter nosičů peroskvit (pokrytí vrstvou silikagelu), lze předpokládat, že mechanismus reversibilní adsorpce DNA pomocí manganatých nosičů peroskvit je stejný jako je tomu v případě použití polymerních magnetických nosičů P(HEMA-co-GMA) pokrytých karboxylovými funkčními skupinami [12], [14], [15], [29], [36], [107].

Prezentované výsledky ukazují, že magnetické nosiče manganatého peroskvitu $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ pokryté vrstvou silikagelu jsou vhodné pro izolaci DNA z různých typů vzorků, včetně komplexních reálných vzorků v kvalitě vhodné pro PCR. Reversibilní adsorpce DNA na povrch manganatých nosičů peroskvit byla provedena ve prostředí systému vodné fáze. Optimální složení separační směsi bylo 16% PEG 6000 a 2M NaCl. Maximální reprodukovatelnost účinnosti separační metody za využití testovaných nosičů se pohybovala kolem 40 % výchozího množství DNA ve vzorku. Kontrolní metodou za použití komerčních magnetických částic MPG[®] byla izolováno v množství DNA řádově shodném s množstvím DNA separované nosiči peroskvit v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl.

Vyvinutý postup separace DNA byl úspěšně aplikován na izolaci DNA v kvalitě vhodné pro PCR z reálných vzorků (mléčné výrobky, potravinové doplňky). DNA byla za experimentálních podmínek získána v kvalitě a množství vhodném pro detekci metodu PCR a PCR v reálném čase. Kvantifikací metodou PCR v reálném čase se podařilo prokázat řádově shodné množství DNA s předpokládaným obsahem DNA

Výsledky byly publikovány ve formě článku *Silica coated $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ nanoparticles for magnetically driven DNA isolation* v časopise *Journal of Separation Science* [50] (v celé šíři uveden v příloze dizertační práce), přednášek *Lanthanum Manganese Perovskite Nanoparticles for Molecular Diagnostic Application* v rámci Studentské Odborné Konference Chemie a Společnost, VUT v Brně, ČR (2010), *Využití magnetických nanonosičů pro izolaci DNA z probiotických mléčných výrobků* v průběhu VI. Symposia Společnosti pro probiotika a prebiotika. ČZU Praha, ČR (2010) a plakátových sdělení na 6th International Conference on Materials Structure and Micromechanics of Fracture, Brno, ČR (2010) a 11th International Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials, Pretoria, South Africa (2011).

10 REVERSIBILNÍ ADSORPCE DNA NA TERMOSENZITIVNÍ NOSIČE

Termosenzitivní, (teplotně citlivé) materiály představují díky svým vlastnostem perspektivní využití v řadě oblastí, včetně adheze biologických materiálů na jejich povrch [39].

Schopnost izolace genomové bakteriální DNA pomocí nosičů P(NIPAAm-*co*-GMA-*co*-MBAAm) a magnetických nosičů P(NIPAAm-*co*-MBAAm) (NIP 182) byla testována v prostředí dvoufázového vodného systému (16% PEG 6000, 2M NaCl). Byly použity různé druhy termosenzitivních nosičů (Tabulka 2), magnetické a nemagnetické.

Mechanismus adsorpce DNA na povrch nosičů, vycházející z vlastností materiálu, z nichž byly nosiče syntetizovány, předpokládá, že při nižší teplotě (10 °C) bude schopnost adsorpce kondenzované DNA na nosiče nižší (Horák, 2011, osobní sdělení). Při vyšší teplotě (40 °C) tomu bude naopak. Tato termosenzitivita byla testována adsorpcí a elucí DNA na povrch nosičů za různých teplot. Následně byla ověřena možnost využití termosenzitivních nosičů pro izolaci nukleových kyselin z různých typů komplexních vzorků (probiotických mléčných výrobků a doplňků stravy).

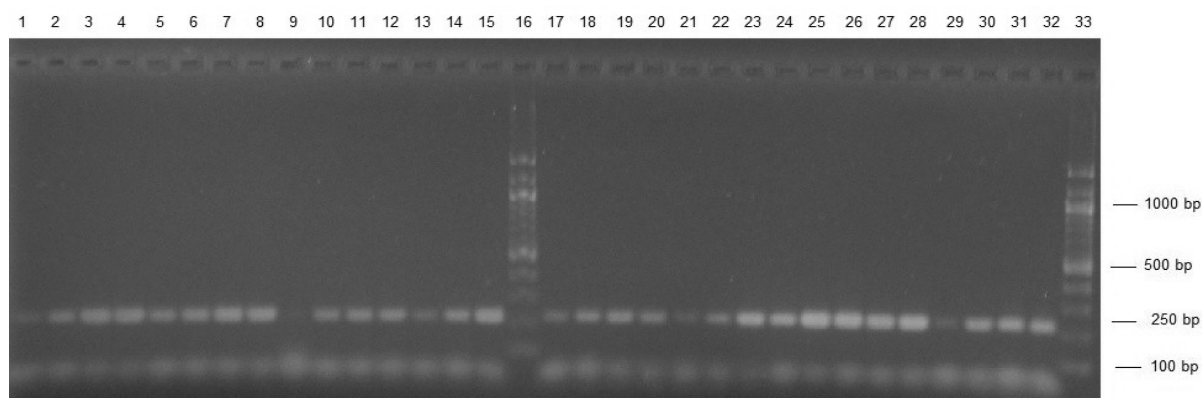
10.1 Testování schopnosti separace nukleových kyselin

Ověření schopnosti separace bakteriální DNA termosenzitivními nosiči byla provedena za použití purifikované bakteriální DNA *Lactobacillus gasseri* K7 o výchozí koncentraci 100 ng/μl ($A_{260/280\text{ nm}} = 1,90$). Adsorpce a eluce DNA byla provedena při teplotě 10 °C a 40 °C. DNA byla eluována do TE pufru o různém pH. Při vyhodnocování vlivu pH na eluční schopnost, bylo nutné vzít v úvahu změnu pH TE pufru v závislosti na teplotě. Při zohlednění tohoto vlivu, kdy pKa TE pufru se zvyšuje přibližně o 0,03 jednotky při poklesu teploty o 1 °C [63] bylo nejlepšími výsledky, tedy nejvyšší koncentrace eluované DNA dosaženo při pH TE pufru 9,5 a 7,8 při teplotě 40 °C (Tabulka 25). Získané výsledky potvrdily že, DNA separovaná a eluovaná při teplotě 40 °C měla vyšší koncentraci než DNA separovaná a eluovaná při 10 °C.

Tabulka 25: Izolace DNA termosenzitivními nosiči při různé teplotě adsorpce a eluce DNA

<i>pH pufru</i>	<i>pH 7,8</i>		<i>pH 8,5</i>		<i>pH 9,01</i>		<i>pH 9,5</i>	
<i>teplota adsorpce a eluce</i>	10 °C	40 °C	10 °C	40 °C	10 °C	40 °C	10 °C	40 °C
<i>nosiče</i>	<i>koncentrace (ng/μl)</i>							
NIP 23	6,3	25,8	5,0	34,3	16,0	26,5	14,5	23,3
NIP 53	7,0	28,8	13,5	27,8	13,5	26,8	11,8	20,0
NIP 26	16,3	29,5	16,0	21,8	6,5	21,2	15,0	23,2
NIP 182	3,8	35,8	6,8	38,0	4,8	21,8	6,0	26,5
PG 58	13,5	14,8	12,3	29,8	13,5	23,8	11,2	27,3

Kvalita eluovaná DNA byla potvrzena pomocí PCR za využití primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102] s následnou gelovou elektroforézou (Obrázek 25).



Obrázek 25: Gelová elektroforéza PCR produktu získaného amplifikací DNA (primery specifické pro rod *Lactobacillus* [77]) izolované termosensitivními nosiči při různé teplotě (10 a 40 °C).

Běh č.: (1-15) DNA izolována při teplotě 10 °C, (17-32) DNA izolována při teplotě 40 °C, (17, 33) žebříček 100 bp, (1-4), (17-20) NIP 26 pH 7,8; 8,5; 9,01; 9,5, (5-8), (21-24) NIP 53 pH 7,8; 8,5; 9,01; 9,5, (9-12), (25-28) NIP 182 pH 7,8; 8,5; 9,01; 9,5, (13-16), (29-32) NIP 23 pH 7,8; 8,5; 9,01; 9,5.

Bylo prokázáno, že teplota separace DNA má vliv na množství izolované DNA. Při vyšší teplotě se zvyšuje separační schopnost, tedy množství izolované DNA. Množství DNA izolované za jejich použití při teplotě 40 °C je vyšší než při teplotě nižší.

Provedená stanovení potvrdila možnost využití termosenzitivních nosičů pro izolaci nukleových kyselin v kvalitě a množství vhodném pro PCR reakci.

10.2 Izolace DNA magnetickými termosensitivními nosiči

Termosenzitivita materiálu, tedy schopnost zmenšit svůj objem a / nebo nabobtnat ve vodném prostředí v důsledku změny teploty byla ověřena adsorpcí a následnou elucí DNA na povrch termosensitivních P(NIPAAm-co-MBAAm) magnetických nosičů NIP 182 za různých teplot. Jako výchozí matrice byla použita DNA *Lactobacillus gasseri* K7 o koncentraci 100 ng/μl ($A_{260/280nm} = 2,1$) a hrubý lyzát buněk bakteriální kultury *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06. Separace byla provedena v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl.

Tabulka 26: Koncentrace DNA izolované termosenzitivními magnetickými nosiči NIP 182 za různé teploty adsorpce a eluce.

	<i>Testované kombinace teplot adsorpce a eluce</i>					
<i>Teplota adsorpce</i>	40 °C	10 °C	40 °C	10 °C	40 °C	10 °C
<i>Teplota eluce</i>	40 °C	10 °C	10 °C	40 °C	LT	LT
	<i>Koncentrace DNA (ng/ul)</i>					
DNA <i>Lbc. gasseri</i> K7	14,2	12,9	13,2	11,0	15,6	10,2
HL CCDM 211/06	28,3	2,8	10,1	11,5	14,2	8,8

Provedené stanovení ukázalo, že testované nosiče jsou vhodné pro izolaci DNA z hrubých lyzátů buněk. Koncentrace DNA získaná spektrofotometrickým měřením potvrdila (Tabulka 26), že množství izolované DNA je závislé na teplotě.

10.3 Izolace DNA z reálných vzorků pomocí nosiče NIP 182

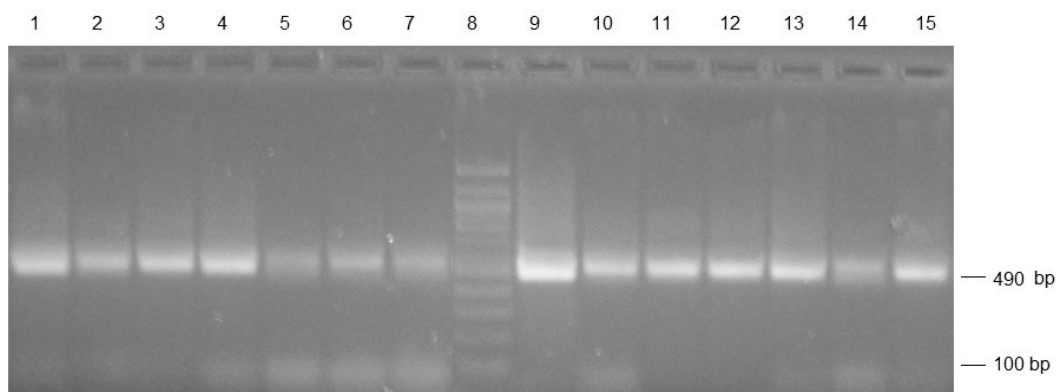
Za zvolených experimentálních podmínek (16% PEG, 2M NaCl), byla otestována možnost použití termosenzitivních magnetických nosičů NIP 182 pro separaci nukleových kyselin z hrubých lyzátů buněk připravených z reálných vzorků (mléčné výrobky, probiotické doplňky stravy). DNA byla eluována do TE pufru o různém pH, při různé kombinaci teplot adsorpce a eluce. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 27.

Tabulka 27: Izolace DNA z reálných vzorků metodou magnetické separace (nosiče NIP 182, 16%PEG 6000, 2M NaCl), různá teplota adsorpce DNA na nosiče a eluce DNA do TE pufru.

<i>Teplota adsorpce</i>	<i>Testované kombinace teplot adsorpce a eluce</i>					
	40 °C	10 °C	40 °C	10 °C	40 °C	10 °C
<i>Teplota eluce</i>	40 °C	10 °C	10 °C	40 °C	LT	LT
<i>Testované výrobky</i>	<i>Koncentrace DNA (ng/ul)</i>					
Nutrolin-B plus	28,4	4,9	20,6	13,4	37,0	16,9
Biopron Junior	7,3	3,2	8,9	9,7	9,1	5,4
Linex [®] Forte	21,5	13,1	21,7	13,5	17,9	14,0
Pangamin Bifi s inulinem	14,7	13,4	15,3	20,6	21,4	11,4
Bílý jogurt St. Pierre	19,4	9,8	22,2	16,2	24,7	13,3
Zott bílý	26,7	3,5	8,2	5,8	8	7,7
Activia bílá	35,1	3,25	14,5	12,8	19,6	12,4

Spektrofotometrickým stanovením koncentrace izolované DNA (Tabulka 27) bylo potvrzeno, že nejnižší koncentrace byla získána při teplotě adsorpce a eluce 10 °C a naopak nejvyšší při teplotě 40 °C.

Kvalita a amplifikovatelnost DNA byla provedena pomocí PCR specifické pro doménu *Bacteria* za využití odpovídajících primerů [103]. Specifita PCR produktů (466 bp) byla ověřena gelovou elektroforézou (Obrázek 26). Intenzita PCR produktů odpovídá spektrofotometrické koncentraci izolované DNA.



Obrázek 26: Gelová elektroforéza vybraných PCR prouků (primery specifické pro doménu *Bacteria* [78] po amplifikaci DNA izolované z hrubých lyzátů buněk reálných vzorků.

Běh č.: (1-7) adsorpce DNA při teplotě 10 °C, eluce při LT, (8) žebříček 100 bp, (9-15) adsorpce DNA při teplotě 40 °C, eluce při LT, (1, 9) Nutrolin-B plus, (2, 10) Biopron Junior, (3, 11) Linex[®] Forte, (4, 12) Pangamin Bifi s inulinem, (5, 13) Bílý jogurt St.Pierre, (6, 14) Activia bílá.

10.4 Diskuze

Cílem práce bylo prokázání možnosti využití termosenzitivních polymerních nosičů pro izolaci DNA z komplexních reálných vzorků. Problematika mechanismu separace a termosenzitivity nosičů je nastíněna pouze okrajově a bude předmětem dalšího studia.

Termosenzitivní materiály použité pro syntézu nosičů se vyznačují schopností změnit svůj objem v závislosti na teplotě, při vyšší teplotě dochází ve vodném prostředí k jejich nabobtnání [39], [43]. Mechanismus reakce předpokládá, že při teplotě nad 32 °C dochází ve vodném prostředí ke kolapsu hydrofilních cívek do hydrofobní globulí, v důsledku čehož dojde ke zmenšení objemu nosiče. Jedná se o vratný proces, který umožňuje díky hydrofobním vlastnostem při teplotách nad 32 °C adsorpci DNA a při nízkých teplotách (pod 32 °C) její uvolnění. [43] Při vyšší teplotě (40 °C) dojde k adsorpci DNA na povrch nosiče, po následné magnetické separaci je uvolnění DNA z nosiče prováděno při nižší teplotě (LT, 10 °C). Se změnou teploty dochází ke změně hydrofobních parametrů nosičů – funkční karbonylové nebo $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ skupiny jsou na při teplotě 40 °C orientovány povrchu mikronosičů [39]. Interkace nukleových kyselin s povrchem termosenzitivních nosičů je zřejmě podmíněna kondenzací DNA do kompaktního, relativně hustého stavu v prostředí PEG 6000 a NaCl [64] - [67].

Bylo prokázáno, že všechny testované typy termosenzitivních nosičů jsou vhodné pro izolaci genomové bakteriální DNA z hrubých lyzátů buněk připravených z komplexních vzorků i čisté bakteriální kultury v kvalitě a množství vhodném pro PCR, případně qPCR. Na základě výsledků získaných při použití uvedených nosičů k izolaci DNA z purifikované DNA *Lactobacillus gasseri* K7 o koncentraci 100 ng/ul získané fenolovou extrakcí, lze říci, že účinnost separace je v závislosti na teplotě separace (adsorpce a eluce DNA). Za vyšší teploty je množství separované DNA vyšší než při teplotě nižší. Separovaná DNA byla amplifikována v qPCR za využití primerů specifických pro doménu *Bacteria* [103]. Výsledky odpovídající mechanismu působení termosenzitivních nosičů byly získány za využití varianty kombinující teploty adsorpce 40 °C a eluce při LT. Lze tedy říci, že DNA je ve vyšší koncentraci na nosiče adsorbována při vyšší teplotě (40 °C). Zároveň je nutné poznamenat, že koncentrace eluované DNA úměrně klesá s poklesem teploty eluce DNA z nosiče.

Výsledky nebyly dosud publikovány, částečně budou prezentovány v rámci plánované přednášky *Characterization of magnetic and non-magnetic solid polymer microspheres* na konferenci Chemistry and Life 2011, Brno, ČR.

11 VYUŽITÍ MAGNETICKÝCH NOSIČŮ PRO OPTIMALIZACI METODY EMA-PCR

Optimalizace metody spojující působení ethidium monoazidu (EMA) a polymerázové řetězové reakce (PCR) - (EMA-PCR) byla provedena za využití bakteriálního kmene *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06. Bylo testováno několik postupů inaktivace bakteriálních buněk, doba působení EMA na bakteriální buňky a doba fotoaktivace DNA halogenovou lampou. Pro odstranění kontaminantů a inhibitorů PCR reakce byla použita metoda magnetické separace za využití magnetických polymerních mikronosičů P(HEMA-co-GMA) (Fkol 135 ox).

Optimalizace podmínek metody EMA-PCR byla rozdělena do čtyř fází:

1. Optimalizace podmínek působení EMA na DNA a bakteriální buňky.
2. Purifikace DNA metodou magnetické separace.
3. Aplikace optimalizované metody EMA-PCR na reálné vzorky.
4. Porovnání působení EMA a propidiumu monoazidu (PMA)

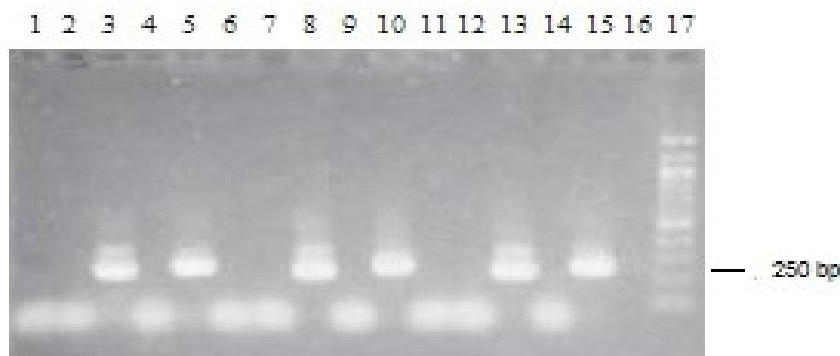
Vyvinutá metoda byla použita pro rozlišení živých a mrtvých buněk v různých druzích mléčných výrobků.

11.1 Optimalizace podmínek působení EMA

11.1.1 Působení EMA na DNA

Byla ověřena schopnost EMA kovalentně se vázat na DNA (a tím inhibovat PCR). Byla použita DNA izolovaná z buněk *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06 o koncentraci 10 ng/μl. Purifikace bakteriální DNA (100 μl) byla provedena metodou magnetické separace (kapitola 5.4.3) pomocí magnetických P(HEMA-co-GMA) mikronosičů (2 mg/ml).

DNA byla při laboratorní teplotě inkubována s EMA (0,1 mg/ml) po dobu 5 min. DNA (1, 2 a 5 μl) v PCR směsi byla amplifikována pouze v případech, kdy nedošlo k působení EMA (kontrola). Po působení EMA (5 minut) a fotoaktivaci (5 minut) se DNA v PCR neamplifkovala (Obrázek 27).



Obrázek 27: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus* (250 bp) [102] získaných amplifikací purifikované DNA *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06 (1, 2 a 5 μl) po působení EMA.

Běh č.: (1-3) 1 μl DNA ve směsi pro PCR, (1-2) DNA po působení EMA, (3) DNA bez působení EMA, (6-8) 2 μl DNA ve směsi pro PCR, (6-7) DNA po působení EMA, (8) DNA bez působení EMA, (11-13) 5 μl DNA v PCR směsi, (11-12) DNA po působení EMA, (13) DNA bez působení EMA, (4, 9, 14) negativní kontrola, (5, 10, 15) pozitivní kontrola (DNA *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06 - 10 ng/μl).

11.1.2 Působení EMA na bakteriální buňky

Za testovaných experimentálních podmínek byla optimální doba působení EMA o koncentraci 0,1 mg/ml na bakteriální buňky 10 minut s následnou 5 minutovou fotoaktivací. V PCR reakci za použití primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102] byla amplifikována DNA izolovaná z buněk, které nebyly inaktivovány. Ve srovnání s živými buňkami, produkty PCR z inaktivovaných buněk měly výrazně nižší intenzitu v závislosti na způsobu inaktivace buněk. Použité metody inaktivace buněk jsou uvedeny v Tabulce 28.

Po inaktivaci testovaných bakteriálních buněk (1% formaldehyd v PBS, 70% isopropanol, var a jejich kombinace) nedocházelo po 24 - 96 hodinové inkubaci při teplotě 37 °C k růstu ošetřených buněk (Tabulka 28).

Tabulka 28: Testování životaschopnosti inaktivovaných bakteriálních buněk.

<i>Inaktivace buněk</i>	<i>Růst kolonií po 24 hod. kultivaci</i>		<i>Růst kolonií po prodloužené kultivaci (96 hod.)</i>	
	<i>inaktivované buňky</i>	<i>kontrolní buňky</i>	<i>inaktivované buňky</i>	<i>kontrolní buňky</i>
1% formaldehyd v PBS	-	+	-	+
70% isopropanol	-	+	-	+
1% formaldehyd v PBS + var	-	+	-	+
70% isopropanol + var	-	+	-	+
var	-	+	-	+

+ nárůst kolonií po kultivaci

- nedošlo k nárůstu kolonií po kultivaci

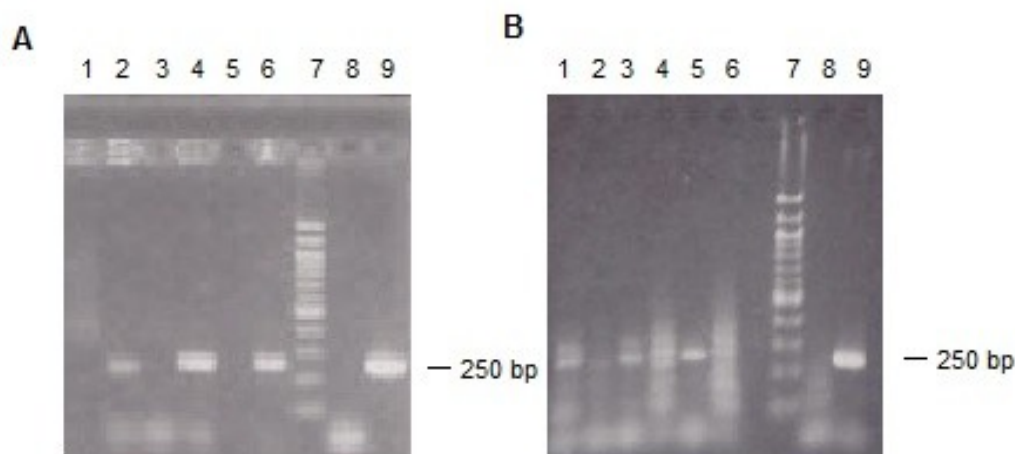
Po amplifikaci DNA v PCR došlo k detekci slabého PCR produktu ve všech vzorcích, mimo kombinace působení 70% isopropanolu a 20 minutového varu. Aplikace 70% isopropanolu po dobu 10 a 20 minut opakovaně nevedla k usmrcení buněk. Důvodem amplifikace DNA i z inaktivovaných buněk (po působení EMA) může být skutečnost, že v některých případech byly buňky subletálně poškozené (buňky živé, ale nekultivovatelné).

11.2 Purifikace DNA metodou magnetické separace

Působení EMA (5 minut) a následné fotoaktivaci (5 minut) byly vystaveny buňky čerstvě narostlé bakteriální kultury *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06 ($A_{600nm} = 1,00$). Jedna sada vzorků buněk byla inaktivována působením kombinace 70% isopropanolu a varu, druhá sada vzorků inaktivována nebyla. Po působení EMA a fotoaktivaci byly bakteriálních buněk lyzovány varem (15 minut).

Purifikace bakteriální DNA po působení i bez působení EMA byla provedena metodou magnetické separace (kapitola 5.9.3) využívající magnetické polymerní nosiče P(HEMA-co-GMA) označované jako Fkol 77ox o koncentraci (2 mg/ml) v prostředí 8% PEG 6000 a 2M NaCl. DNA purifikovaná metodou magnetické separace byla použita jako DNA matrice do PCR amplifikace byla provedena pomocí primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102] (velikost PCR produktů 250 bp). Pro srovnání byla provedena také PCR amplifikace bakteriální DNA, která

byla připravena shodným způsobem (zpracování bakteriálních buněk, působení EMA, fotoaktivace, lyze buněk), ale nebyla přečištěna magnetickou separací (Obrázek 28).



Obrázek 28: Agarosová gelová elektroforéza EMA-PCR produktů specifických pro rod *Lactobacillus* (250 bp) [102].

(A) DNA přečištěná metodou magnetické separace - běh č.: (1, 3, 5) po působení EMA, (2, 4, 6) bez působení EMA. (B) DNA bez přečištění metodou magnetické separace – běh č.: (1, 3, 5) bez působení EMA, (2,4,6) po působení EMA. Běh č.: (7) žebříček 100 bp, (8) negativní kontrola, (9) pozitivní kontrola DNA *Lactobacillus* 10 ng/μl.

Z výsledků vyplývá, že magnetickou separací došlo k přečištění DNA a v důsledku toho i lepší amplifikaci DNA. DNA byla izolována v kvalitě a množství vhodném pro provedení PCR reakce.

11.2.1 Srovnání metody lyze buněk

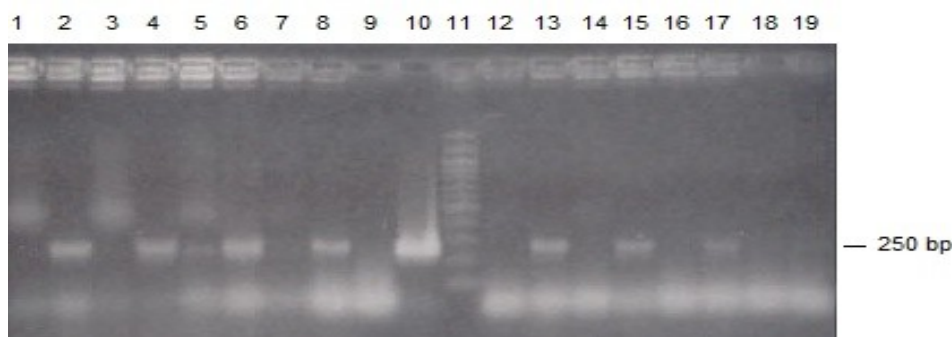
Po působení EMA na bakteriální buňky je nutné před amplifikací v PCR uvolnit chromozomální DNA z bakteriálních buněk. Za tímto účelem byly testovány dvě metody lyze buněk: (A) varem a (B) působením lysozymu (3 mg/ml).

Lyzi buněk byly podrobeny bakteriální buňky *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06 ($A_{600nm} = 1,00$) po působení i bez působení EMA (5 min) a následné fotoaktivaci (5 min). Purifikace bakteriální DNA po působení i bez působení EMA byla provedena metodou magnetické separace využívající magnetické polymerní nosiče P(HEMA-co-GMA) označované jako Fkol 77ox o koncentraci (2 mg/ml) v prostředí 8% PEG 6000 a 2M NaCl. DNA byla z připraveného lyzátu buněk purifikována metodou magnetické separace za podmínek uvedených v předchozí kapitole. Do PCR specifické pro rod *Lactobacillus* [102] bylo použito 1 μl a 5 μl DNA matrice. Výsledky PCR jsou uvedeny na Obrázku 29 a Obrázku 30.



Obrázek 29: Agarosová gelová elektroforéza EMA-PCR produktů při použití primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102] (250 bp). Lyze buněk působením lysozymu (3 mg/ml).

Běh č.: (1-10) 5 μ l DNA v PCR směsi, (12-19) 1 μ l DNA v PCR směsi, (1, 3, 5, 7) po působení EMA, (2, 4, 6, 8) bez působení EMA, (9) negativní kontrola, (10) pozitivní kontrola DNA *Lactobacillus* 10 ng/ μ l, (11) žebříček 100 bp, (12, 14, 16, 18) po působení EMA, (13, 15, 17, 19) bez působení EMA.



Obrázek 30: Agarosová gelová elektroforéza EMA-PCR produktů za použití primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102] (250 bp). Lyze buněk varem (15 min),.

Běh č.: (1-10) 5 μ l DNA v PCR směsi, (12-19) 1 μ l DNA v PCR směsi, (1, 3, 5, 7) po působení EMA, (2, 4, 6, 8) bez působení EMA, (9) negativní kontrola, (10) pozitivní kontrola DNA *Lactobacillus* 10 ng/ μ l, (11) žebříček 100 bp, (12, 14, 16, 18) po působení EMA, (13, 15, 17, 19) bez působení EMA.

Na základě výsledků byl jako vhodný způsob lyze bakteriální buněk zvolen var (15 minut) (Obrázek 29). V případě použití lysozymu byly po amplifikaci detekovány nespecifické PCR produkty a dimery primerů (Obrázek 30), i po použití metody magnetické separace za účelem purifikace DNA.

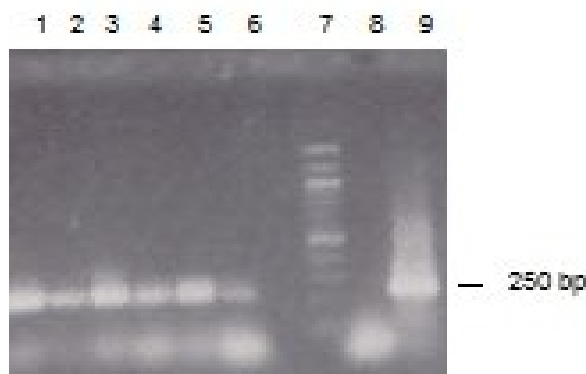
Vhodné množství DNA purifikované metodou magnetické separace v PCR směsi, při amplifikaci DNA pomocí primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102] v případě celkového objemu PCR směsi 25 μ l je 5 μ l DNA. PCR produkty získané amplifikací 1 μ l DNA se vyznačují nižší intenzitou.

11.3 Aplikace optimalizované metody EMA-PCR na reálné vzorky

Experiment byl proveden s vybraným mléčným výrobkem, kterým byl bílý jogurt Klasik (OLMA, Olomouc) s různou dobou expirace (před a po datu expirace).

Kontrola životaschopnosti bakteriálních buněk byla provedena naočkováním na pevné MRS médium a následující kultivací při teplotě 37 °C po dobu 6 dnů. Naočkovány byly buňky, na které nebylo působeno EMA, i buňky po působení EMA. V závislosti na době, která proběhla od doporučené doby spotřeby jogurtu, se snižovalo množství kolonií, které narostly po kultivaci na MRS mediu. Po působení EMA došlo k nárůstu kolonií až po prodloužené době kultivace.

Pomocí EMA-PCR specifické pro rod *Lactobacillus* [102] byl produkt PCR (250 bp) amplifikován o různé intenzitě u všech vzorků. Intenzita PCR produktů (Obrázek 31) detegovaných u vzorků, na které nebylo působeno EMA je shodná, neliší se tedy v závislosti na době expirace testovaného výrobku. Důvodem zjištění, že byla amplifikována DNA nejen z živých bakteriálních buněk, ale také usmrčených. Naopak intenzita PCR produktu připraveného z buněk po působení EMA je ve srovnání s buňkami, na které nebylo působeno EMA nižší a také se lišila v závislosti na době expirace testovaného výrobku. Ve srovnání s živými buňkami PCR produkt usmrčených buněk vykazoval nižší intenzitu. PCR produkt byl detekován pouze v případě použití 5 μ l DNA přečištěné magnetickým nosičem do PCR směsi (Obrázek 31).



Obrázek 31: Agarosová gelová elektroforéza EMA-PCR produktů (250 bp) získaných po amplifikaci DNA pomocí primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102] z reálných vzorků s rozdílnou dobou expirace (po izolaci DNA metodou magnetické separace).

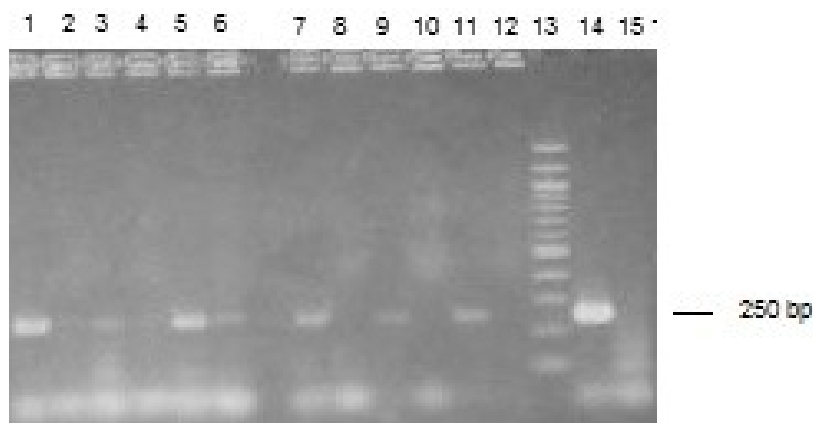
5 μ l DNA izolované z mléčného výrobku s rozdílnou dobou expirace (po purifikaci metodou magnetické separace) za použití primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [64] (250 bp).

Běh č. (1) bez expirace, bez působení EMA, (2) bez expirace, po působení EMA, (3) 12 dní po expiraci, bez působení EMA, (4) 12 dní po expiraci, po působení EMA, (5) 32 dní po expiraci, bez působení EMA, (6) 32 dní po expiraci, po působení EMA, (7) žebříček 100 bp, (8) negativní kontrola, (9) pozitivní kontrola DNA *Lactobacillus* 10 ng/ μ l.

11.4 Porovnání PMA-PCR a EMA-PCR

Možnost zdokonalení metody PCR k rozlišení živých a mrtvých buněk nejen v potravinových výrobcích může být dosaženo nahrazením ethidium monoazidu (EMA) propidium monoazidem (PMA), který se vyznačuje vhodnějšími vlastnostmi (PMA na rozdíl od EMA nemá schopnost v některých případech pronikat i do živých bakteriálních buněk) [82], [90].

Pro porovnání účinku PMA a EMA byly použity bakteriální buňky *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211/06 ($A_{600nm}=1,00$). Tři paralelní vzorky, byly zpracovány dle optimalizované metody EMA-PCR. Pro kontrolu vlivu EMA/PMA byly připraveny i vzorky bez působení EMA/PMA. Následnou amplifikací DNA, která byla provedena pomocí primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102] byly získány PCR produkt o různé intenzitě (Obrázek 32).



Obrázek 32: Agarosová gelová elektroforéza produktů PMA-PCR a EMA-PCR získaných po amplifikaci DNA
 1 μ l DNA ve směsi pro PCR v celkovém objemu 25 μ l izolované z mléčného výrobku za použití primerů specifických pro rod *Lactobacillus* [102] (velikost PCR produktu 250 bp).
 EMA-PCR (běh 1-6): běh č.: (1, 3, 5) bez působení EMA, (2, 4, 6) po působení EMA.
 PMA-PCR (běh 7-12): běh č.: (7, 9, 11) bez působení PMA, (8, 10, 12) po působení PMA
 Běh č.: (13) žebříček 100 bp, (14) pozitivní kontrola DNA *Lactobacillus* 10 ng/ μ l, (15) negativní kontrola.

Dosažené výsledky gelové elektroforézy PCR produktů (250 bp) potvrzují závěry publikované v literatuře [82], [90], že EMA má na rozdíl od PMA schopnost pronikat i do živých bakteriálních buněk. V důsledku průniku EMA i do živých bakteriálních buněk některých druhů, tedy buněk s nepoškozenou buněčnou membránou může dojít k ovlivnění výsledků stanovení. Značně vyšší selektivita PMA je pravděpodobně způsobena vyšším nábojem molekuly PMA (EMA má jeden kladný náboj a PMA má dva) [90].

11.5 Diskuze

Dosažené výsledky potvrzují, že metoda kombinující působení ethidium monoazidu s polymerázovou řetězovou reakcí je vhodná pro detekci živých a mrtvých buněk.

Pomocí EMA-PCR bylo docíleno rozlišení živých a mrtvých buněk po usmrcení kombinací varu (15 minut) a působení 70% isopropanolu (20 min). Optimální doba inkubace s EMA a doba ozařování halogenovou lampou byla 5 minut. Optimalizovaná metoda byla úspěšně aplikována na reálné vzorky, konkrétně mléčné výrobky. Na základě výsledků experimentální práce byla zkrácena doba působení EMA na bakteriální buňky z 10 minut [109] na 5 minut. Bylo zjištěno, že interval 5 minut je pro působení EMA na inaktivované buňky dostatečný. Zkrácení časového intervalu působení EMA na bakteriální buňky zároveň snižuje možnost ovlivnění selektivity metody v důsledku průniku EMA i do živých buněk [97]. Magnetickou separací využívající magnetické polymerní nosiče P(HEMA-co-GMA) označované jako Fkol 77ox o koncentraci (2 mg/ml) v prostředí 8% PEG 6000 a 2M NaCl došlo k přečištění DNA a v důsledku toho i lepší amplifikaci DNA. DNA byla izolována v kvalitě a množství vhodném pro provedení PCR reakce.

Porovnáním metody EMA-PCR a PMA-PCR byly potvrzeny závěry publikované v literatuře [90], [91], [94], že EMA může za určitých podmínek pronikat i přes membránu živých buněk některých bakteriálních druhů, a to zřejmě v důsledku nižšího náboje EMA (1+) v porovnání s PMA (2+) [90]. PMA vykazuje vyšší selektivitu a prostupuje pouze do buněk s nefunkční buněčnou membránou [94]. Bylo ověřeno, že po 5 minutové inkubaci živých bakteriálních buněk s PMA a následné fotoaktivaci nedošlo (v porovnání s EMA) k průniku do buněk [88]. V současné době již bylo publikováno několik prací zabývajících se možností kvantifikace živých a mrtvých buněk za

využití metody kombinace působení EMA, případně PMA a PCR v reálném čase (qPCR) [91], [98], [99], [112].

Část z uvedených výsledků optimalizace metody EMA-PCR pro detekci živých a mrtvých buněk v mléčných výrobcích byla publikována ve formě článku - *Identification of viable Lactobacillus cells in fermented dairy products*, *Chemické listy* (2008) [109] uvedeného v plném znění v příloze dizertační práce, dále plakátového sdělení na studentské vědecké konferenci XII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů. Brno, Masarykova univerzita (2008) a formou přednášky v rámci V. Symposia Společnosti pro probiotika a prebiotika. ČZU Praha (2009).

ZÁVĚR

V rámci předkládané dizertační práce byl vypracován postup izolace a purifikace celkové DNA z komplexních vzorků s využitím reversibilní imobilizace DNA na pevných magnetických nano- a mikro-nosičích. Získané výsledky lze shrnout v následujících bodech:

Optimalizace podmínek metody reverzní imobilizace DNA na pevné fázi

Za použití polymerních magnetických nosičů (P(HEMA-*co*-GMA) funkcionalizovaných různým množstvím karboxylových funkčních skupin byla optimalizována metoda izolace bakteriální DNA, z hrubých lyzátů buněk čisté bakteriální kultury. Bylo optimalizováno složení a pořadí komponent (tj. matrice DNA, PEG, NaCl a magnetického nosiče) separační směsi. Byly optimalizovány podmínky eluce DNA (teplota, doba eluce) z nosičů.

Nejvyšší návratnosti DNA bylo dosaženo v prostředí 16% PEG 6000 a 2M NaCl, při pořadí komponent v separační směsi: H₂O, NaCl, PEG, DNA, magnetické nosiče. Shodné výsledky byly získány i u dalších typů nosičů (P(HEMA-*co*-GMA), P(HEMA-*co*-EDMA), PGMA, La_{0.75}Sr_{0.25}MnO₃, a termosenzitivních poly(*N*-isopropylakrylamidové) nosičů.

Interference magnetických nosičů v PCR

Pomocí qPCR byla studována interference magnetických polymerních nosičů při amplifikaci DNA v polymerázové řetězové reakci (PCR).

U polymerních magnetických nosičů byla interference (v přítomnosti více než 5 ng nosičů (2 mg/ml) v PCR směsi o objemu 25 µl) prokázána u nosičů P(HEMA-*co*-GMA) (Fkol 135ox), PGMA (Fkol B30ox) a P(HEMA-*co*-GMA)ox (C 103). Polymerní nosiče PGMA (C 25) ovlivňovaly fluorescenční signál amplifikačních křivek v qPCR již od 1 ng nosičů (2 mg/ml) v 25 µl PCR směsi. Interference v PCR byla prokázána v přítomnosti testovaných druhů komerčně dostupných magnetických nosičů (magnetické nosiče MPG[®], magnetické sklo, magnetické částice DynaBeads) určených pro práci s nukleovými kyselinami.

Bylo prokázáno, že nanonosiče manganatého peroskvitu La_{0.75}Sr_{0.25}MnO₃ neovlivňují amplifikaci DNA v qPCR až do množství 9 µl respektive 5 µl suspenze nosičů v 25 µl PCR směsi. Stejně tak ani testované druhy termosenzitivních poly(*N*-isopropylakrylamidových) nosičů nevykazovaly v rámci testovaného množství nosičů (0,5 – 5 µl) v PCR směsi (25 µl) žádnou interferenci v PCR a jejich přítomnost neovlivňovala účinnost amplifikace DNA.

Aplikace magnetických nosičů při izolaci DNA z reálných vzorků

Bylo prokázáno, že navržená metoda reversibilní imobilizace DNA na pevné nosiče je vhodná pro izolaci DNA z komplexních vzorků obsahujících inhibitory PCR (mléčné výrobky, probiotické doplňky stravy nebo stolice myši). Osvědčila se při purifikaci produktů PCR před následnou analýzou jinými molekulárně diagnostickými metodami, např. (ARDRA).

Při izolaci DNA z různých druhů reálných vzorků byly úspěšně použity magnetické polymerní nosiče, nanočástice manganatého peroskvitu La_{0.75}Sr_{0.25}MnO₃ a termosenzitivní poly(*N*-isopropylakrylamidové) nosiče.

Reversibilní adsorpce DNA na peroskvit

Magnetické nosiče manganatého peroskvitu $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ pokryté vrstvou silikagelu jsou vhodné pro izolaci DNA z různých typů vzorků, včetně komplexních reálných vzorků v kvalitě vhodné pro PCR detekci. Účinnost izolace DNA je za optimálních podmínek 40 %.

Vyvinutý postup izolace DNA byl úspěšně aplikován na izolaci DNA z reálných vzorků (mléčné výrobky, probiotické doplňky stravy, gynekologický preparát). DNA byla získána z testovaných vzorků v kvalitě a množství vhodném pro detekci metodou PCR a PCR v reálném čase.

Reversibilní adsorpce DNA na termosenzitivní nosiče

S použitím termosenzitivních částic byla vyšší koncentrace DNA získána při teplotě adsorpce 40 °C a eluce při laboratorní teplotě, než tomu bylo v případě adsorpce DNA při teplotě 10 °C. Výsledky ukazují, že DNA je ve vyšší koncentraci na nosiče adsorbována při vyšší teplotě (40 °C). Bylo prokázáno, že testované typy termosenzitivních nosičů jsou vhodné pro izolaci genomové bakteriální DNA z hrubých lyzátů buněk připravených z komplexních vzorků i z čisté bakteriální kultury v kvalitě a množství vhodném pro PCR.

Optimalizace metody EMA-PCR a využití magnetických nosičů

Metoda kombinující působení ethidium monoazidu s polymerázovou řetězovou reakcí (EMA-PCR) je vhodná pro detekci živých a mrtvých buněk v potravinových výrobcích. Pomocí EMA-PCR bylo docíleno rozlišení živých a mrtvých buněk po usmrcení kombinací varu (15 minut) a působení 70% isopropanolu (20 min). Optimální doba inkubace s EMA a doba ozařování halogenovou lampou byla 5 minut. Optimalizovaná metoda byla úspěšně aplikována na reálné vzorky, konkrétně mléčné výrobky.

PŘEHLED LITERATURY

- [1] Wilson G.: Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, vol. 63, 3741-3751.
- [2] Sambrook, J., Russel, D. W. *Molecular Cloning (3rd ed.)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2001, 235 p. ISBN 978-087969577-4
- [3] Kasai K.: Size-dependent chromatographic separation of nucleic acids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1993, vol. 618, 203-221.
- [4] Li, L. Z., Liu, Y., Sun, M. S., Shao, Y. M.: Effect of salt on purification of plasmid DNA using size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2007, vol. 1139, 228.
- [5] Pečová, M., Zajoncová, L., Poláková, K., Čuda, J., Šafaříková, M., Šebela, M., Šafařík, I. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich v biochemii a biotechnologii. *Chemické Listy* 2011, vol. 105, 524-530
- [6] Horák, D., Babič, M., Macková, H., Beneš M. J. *Journal of Separation Science*, 2007, vol.30, 1751-1772.
- [7] Dynal – Technical Handbook, *Biomagnetic Techniques in Molecular Biology (2nd ed.)*, Dynal A.S, Oslo, Norway 1995
- [8] Šafařík, I., Šafaříková, M.: Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B.*, 1999, vol. 722, 33-35.
- [9] Taylor, J., Hurst, C., D., Davies, M., J., Sachsinger, N., Bruce, I., B.: Application of magnetite and silica-magnetite composites to the isolation of genomic DNA. *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 890, 159-166.
- [10] Melzak, K. A., Sherwood, C. S., Turner, R. F. B., Haynes, C.: Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. *Journal Colloid Interface Science*, 1996, vol.181, 635-644.
- [11] Španová, A., Rittich, B., Horák, D., Lenfeld, J., Prodělalová, J., Sučíková, J., Štrumcová, S.: Immunomagnetic separation and detection of *Salmonella* cells using newly designed carriers. *Journal of Chromatography A*, 2003, vol. 1009, 215-221
- [12] Rittich, B., Španová, A., Horák, D. J.: Carboxyl-functionalized magnetic microparticle carrier for isolation and identification of DNA in dairy products. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007, vol. 311, 249-254.
- [13] DeAngelis, M. M, Wang, D. G., Hawkins, T. L.: Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic Acids Research*, 1995, vol. 23, 4742-4743
- [14] Horák, D., Rittich, B., Španová, A., Beneš, M. J.: Magnetic microparticulate carriers with immobilized selective ligands in DNA diagnostics, *Polymer*, 2005, vol. 46, 1245-1255.
- [15] Horák, D., Benedyk, N.: Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization in the presence of electrostatically stabilized ferrofluids. *Journal of Polymer Science Polymer Physics Edition*, 2004, vol. 42, 5827-5837.

- [16] McBain, C. S., Yiu, H. P., Dobson.: Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery *International Journal of Nanomedicine*, 2008, vol. 3, 169-180.
- [17] Šálek, P. *Příprava a charakterizace vysoce zesíťných polymerních nosičů*. Pojednání k dizertační práci. Brno, 2010.
- [18] Lu A. H., Salabas E. L., Schüth F.: Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization and application. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, vol. 46, 1222-1244
- [19] Horák, D.: Magnetic polyglycidylmethacrylate microspheres by dispersion polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2001, vol. 39, 3707-3715
- [20] Lenfeld, J.: Magnetic bead cellulose, *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 1993, vol. 272, 147-155
- [21] Ennis, M. P., Wisdom, G. B.: A magnetizable solid phase for enzyme extraction. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1991, vol. 30, 155-164.
- [22] Šafařík, I.: Magnetic biospecific affinity adsorbents for lysozyme isolation. *Biotechnology Techniques* 1991, vol. 5, 111-114.
- [23] Šafařík, I., Šafaříková, M.: Batch isolation of hen egg white lysozyme with magnetic chitin. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 1993, vol. 27, 327-330.
- [24] Hassan, E. E., Parish, R. C., Gallo, J. M.: Optimized Formulation of Magnetic Chitosan Microspheres Containing the Anticancer Agent, Oxanthazole. *Pharmaceutical Research* 1992, vol. 9, 390-397.
- [25] Šafařík, I.: Removal of organic polycyclic compounds from water solutions with a magnetic chitosan based sorbent bearing copper phthalocyanine dye. *Water Research* 1995, vol. 29, 101-105.
- [26] Holmberg A., Blomstergren A., Nord O., Lukacs M., Lundeborg J., Uhlén M.: The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis* 2005, vol. 26, 501-510.
- [27] Horák, D., Španová, A., Tvrdíková, J., Rittich, B.: Streptavidin-modified magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) microspheres for selective isolation of bacterial DNA, *European Polymer Journal*. 2011, vo. 47, 1090-1096.
- [28] Cao L. Q.: Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design. Wiley, Weinheim. 2005,
- [29] Rittich, B., Španová, A., Ohlaseňy, Yu., Lenfeld, J., Rudolf, I., Horák, D., Beneš, M. J.: Characterization of deoxyribonuclease I immobilized on magnetic hydrophilic polymer particles. *Journal of Chromatography B*, 2002, vol. 774, 25-31.
- [30] Wichterle, O., Lím, D.: Hydrophilic gels for biological use. *Nature*, 1960, vol. 185, 117-118.
- [31] Tennikova, T.B., Horák, D., Švec, F., Kolář, J., Čoupek, J., Trushin, S.V., et.al.: Hydrolysed macroporous glycidyl methacrylate - ethylene dimethacrylate copolymer sorbent for size-exclusion high-performance liquid chromatography of synthetic polymers and biopolymers. *Journal of Chromatography A*, 1988, vol. 435, 357-362.
- [32] Lenfeld, J., Švec, F., Kálal, J.: Reactive polymers. LV. Periodate oxidation of poly(2,3-epoxypropyl methacrylate) bound onto silica gel. *Acta Polymerica*, 1986, vol. 37, 377-381.

- [33] Kenawy, E.R., Abdel-Hay, F.I., El-Shanshoury, A.R., El Neseny, M.H.: Biologically active polymers: synthesis and antimicrobial activity of modified glycidyl methacrylate polymers having a quaternary ammonium and phosphonium groups. *Journal Controlled Release*, 1998, vol. 50, 145-152.
- [34] Horák, D., Pollert, E., Macková, H.: Properties of magnetic poly(glycidyl methacrylate) and poly(N-isopropylacrylamide) microspheres. *Journal of Materials Science*, 2008, vol. 43, 5845-5850.
- [35] Horák, S., Semenyuk, N., Lednický, F.: Effect of the reaction parameters on the particle size in the dispersion polymerization of 2-hydroxyethyl and glycidyl methacrylate in the presence of ferrofluid. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2003, vol. 41, 1848-1863.
- [36] Křížová J., Španová, A., Rittich, B., Horák, D.: Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation. *Journal of Chromatography A*, 2005, vol. 1064, 247-253.
- [37] Häfeli, U., Schütt, W., Teller, J., Zborowski, M.: Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers (1sted.), Plenum Press, New York, 1997.
- [38] Rittich, B., Španová, A., Horák, D.: Functionalised magnetic microspheres with hydrophilic properties for molecular diagnostic applications. *Food Research International*, 2009, vol. 42, 493-498.
- [39] Macková, H., Horák, D.: Effect of reaction parameters on properties of thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) microspheres prepared by precipitation and dispersion polymerization. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 2005, vol. 44, 968-982.
- [40] Yoshida, R., Sakai, K., Okano, T., Sakurai, Y.: Pulsatile drug delivery systems using hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1993, vol. 11, 85-108.
- [41] Lee, Ch. F., Wen, C. J., Lin, C. L., Chiu, W. Y.: Thermosensitive and control release behavior of poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) latex particles. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2004, vol. 46, 5734-5741
- [42] Seida, Y., Nakano, Y.: Effect of salt on the property of adsorption in thermosensitive polymer hydrogel. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 1996, vol. 29, 767-772.
- [43] Macková, H., Králová, D., Horák, D.: Magnetic poly(N-isopropylacrylamide) microspheres by dispersion and inverse emulsion polymerization. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 2007, vol. 45, 5884-5898.
- [44] Gong, Y. K., Luo, L., Petit, A., Zukor, D. J., Huk, O. L., Antoniou, J., Winnik, F. M., Mwale, F.: Adhesion of human U937 macrophages to phosphorylcholine-coated surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2005, vol. 72, 1-9.
- [45] Kanazawa, H., Yamamoto, K., Kashiwase, Y., Matsushima, Y., Takai, N., Kikuchi, A., Sakurai, Y., Okano, T.: Analysis of peptides and proteins by temperature-responsive chromatographic system using N-isopropylacrylamide polymer-modified columns. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, 1997, vol. 15, 1545-1550.
- [46] Uguzdogan, E., Denkbaz, E. B., Tuncel, A.: RNA Sensitive N-isopropylacrylamide/Vinylphenylboronic acid random copolymer. *Macromolecular Bioscience*, 2002, vol. 2, 214-222.
- [47] Proďelalová, J.: Dizertační práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy university v Brně. *Molekulární diagnostika potravinářsky významných mikroorganismů*. Brno 2004, 90 s.

- [48] Tian, H., Hühner, A. F. R., Landers, J.P.: Evaluation of silica resins for direct and efficient extraction of DNA from complex biological matrices in a miniaturized format. *Analytical Biochemistry*, 2000, vol. 283, 175-191.
- [49] Baptista, P., Pereira, E., Eaton, P., Doria, G., Miranda, A., Gomes, I., Quaresma, P., Franco, R.: Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, vol. 391, 943-950.
- [50] Trachtová, Š., Kaman, O., Španová, A., Veverka, P., Pollert, E., Rittich, B.: Silica coated $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ nanoparticles for magnetically driven DNA isolation. *Journal of Separation Science*, 2011 (přijato k publikaci).
- [51] Kaman, O., Pollert, E., Veverka, P., Hadova, E., Knizek, K., Marysko, M., Kaspar, P., Klementova, M., Gruenwaldova, V., Vasseur, S., Epherre, R., Mornet, S., Goglio, G., Duguet, E.: Silica encapsulated manganese perovskite nanoparticles for magnetically induced hyperthermia without the risk of overheating. *Nanotechnology*, 2009, 20, ARTN 275610
- [52] Rosypal, S.: *Úvod do molekulární biologie – díl první*. Brno, Nakladatelství Rosypal, 2006. 288 s. ISBN 80-902562-5-2.
- [53] Teif, V. B., Bohinc, K.: Condensed DNA: Condensing the concepts. *Progress in Biophysics and molecular Biology*, 2011, vol.105, 208-222.
- [54] Watson, J. D., Crieck, F. H.: Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953, 171 (4356): 737-738.
- [55] Bloomfield, V. A., Crothers, D. M., Tinoco, I. J.: *Nucleic Acids. Structure, Properties and Functions*. University Science Books, Sausalito, CA 2000.
- [56] Brown, T. A.: *Klonování genů a analýza DNA*. Universita Palackého v Olomouci, Olomouc, 2007, 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6.
- [57] Prnka, T., Šperlink, K.: *Bionanotechnologie, nanobiotechnologie, nanomedicina.*, Repronis Ostrava, 2006, 177 s., ISBN: 80-7329-134-7. [online, cit. 8.6 2011] Dostupné na www.nanotechnologie.cz/storage/nanotechnologie200610.pdf.
- [58] Bílková, K., Králová, B.: *Izolace biomakromolekul*. 1. vydání. Praha, Vydavatelství VŠCHT, 1997. str. 206. ISBN 80-7080-288-X.
- [59] Bloomfield, S. F., Stewart, G. S., Dodd, C. E., Booth, I. R., Power, E. G.: The viable but nonculturable phenomenon explained? *Microbiology*, 1998, vol. 144, 1-3.
- [60] Persson, J., Johansson, H., O., Galaev, I., Mattiasson, B., Tjerneld, F.: Aqueous polymer two-phase systems formed by new thermoseparating polymers. *Bioseparation* 2000, vol. 9, 105-116.
- [61] Xin, X., Madeira, P., P., Macedo, E.,A.: *Representation of Liquid-liquid Equilibria for Polymer-salt Aqueous Two-phase Systems Chemical Engineering Science*, 2004, vol. 59, 1153-1163.
- [62] Zhang, Z., Zhang, L., Chen, L., Chen, L., Wan Q.-H.: Synthesis of Novel Porous Magnetic Silica Microspheres as Adsorbents for Isolation of Genomic DNA. *Biotechnology Progress*, 2006, vol. 22, 514-518.
- [63] Pollard, T. D., Earnshaw, W. C.: *Cell Biology (2nded.)*, Philadelphia, Saunders, 2007. p. 928. ISBN 1416022554.

- [64] Vasilevskaya, V. V., Khokhlov, R., Matsuzawa, Y., Yoshikawa, K.: Collapse of Single DNA Molecule in Poly(Ethyleneglycol) Solutions. *Journal of Chemical Physics*, 1995, vol. 102, 6595.
- [65] Kleideiter, G., Nordmeier, E.: Poly(ethylene glycol)-induced DNA condensation in aqueous/methanol containing low-molecular-weight electrolyte solutions I. Theoretical considerations. *Polymer*, 1999, vol. 40, 4013-4023
- [66] Kleideiter, G., Nordmeier, E.: Poly(ethylene glycol)-induced DNA condensation in aqueous/methanol containing lowmolecular-weight electrolytes solutions. Part II. Comparison between experiment and theory. *Polymer* 1999, vol. 40, 4025-4033.
- [67] Esumi, K., Nakaie, Y., Sakai, K., Torigoe, K. : Adsorption of poly(ethyleneglycol) and poly(arnidoamine)dendrimer from their mixtures on alumina/water and silica/water interfaces. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2001, 194, 7.
- [68] Rittich, B., Španová, A., Šálek, P., Němcová, P. Trachtová, Š.; Horák, D.: Separation of PCR-ready DNA from dairy products using magnetic hydrophilic microspheres and poly(ethyleneglykol) - NaCl water solutions. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2009 vol. 321, 1667-1670.
- [69] Al-Soud, W., A., Råndström, P.: Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, vol. 64, 3748-3753.
- [70] Logan, J., Edwards, K., Saunders, N.: *Real-time PCR Current Technology and Applications*. Caister Academic Pres, Norfolk, USA, 2009, p. 288, ISBN 978-1-904455-39-4.
- [71] Sigma-Aldrich. qPCR Technical guide. [online, cit. květen 2010]
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/pcr/quantitative-pcr/qpcr-technical-guide.html>.
- [72] GeneriBiotech [online, cit. květen 2010] <http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/>
- [73] Rosypal, S.: *Nový přehled biologie. 1. vyd.* Praha, Scientia, 2003. s. 797. ISBN 80-86960-23-4
- [74] Španová, A., Rittich, B.: *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. 1. vyd.,* Brno: VUTIUM, 2010. 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [75] Reimann, S., Grattepanche, F., Rezzonico, E., Lacroix, Ch.: Development of a real-time RT-PCR method for enumeration of viable *Bifidobacterium longum* cells in different morphologies. *Food Microbiol.* 2010, vol. 27, 236-242.
- [76] NewEngland BioLabs [online, cit. prosinec 2009]
<http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0137.asp>.
- [77] Bessetti, J.: An Introduction to PCR Inhibitors., 2007, [online, cit. květen 2011]
www.promega.cz.
- [78] Scheu, P. M., Berghof, K., Stahl, V.: *Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction.* *Food Microbiology*, 1998, vol.15, 13-31.
- [79] Barer, M. R., Smith, R. J., Cooney, R. P., Kimmitt, P. T.: Relationships between culturability, activity and virulence in pathogenic bacteria. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2000, vol. 6, 108-111.

- [80] Colwell, R. R.: Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *J Journal of Infection and Chemotherapy* 2000, vol. 6, 121-125.
- [81] Dodd, C. E., Sharman, R.I., Bloomfield, S. F., Booth, I. R., Stewart, G. S.: Inimical processes: Bacterial self-destruction and sub-lethal injury. *Trends Food Science Technology*, 1997, vol. 8, 238-241.
- [82] Kell, D. B., Kaprelyants, A.S., Weichart, D. H., Harwood, C. R., Barer, M. R.: Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 1998, vol. 73, 169-187.
- [83] Nystrom, T.: Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Arch. Microbiol.* 2001, vol. 176, 159-164.
- [84] Yamamoto, H.: Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-spore-forming bacteria, and its modeling. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2000, vol. 6, 112-114.
- [85] Sachidanandham, R., Yew-Hoong Gin, K., Laa Poh, Ch.: Monitoring of active but non-culturable bacterial cells by flow cytometry. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, vol.89, 24.
- [86] Keer J. T., Biich L.: Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of Microbiology Methods* 2003, vol. 53, 175-183.
- [87] Roth B. L., Poot M., Yue S. T., Miliard P. J.: Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Applied Environmental Microbiology*, 1997, vol. 63, 2421-2431.
- [88] Nocker, A., Mazza, A., Masson, L., Camper, A., K., Brousseau, R.: Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *Journal of Microbiology Methods* 2009, vol. 76, 253-261.
- [89] Lee, J. L., Levin, R. E.: Quantification of total viable bacteria on fish fillets by using ethidium bromide monoazide real-time polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, vol.118, 312-317.
- [90] Nocker A., Cheung Ch. Y., Camper A. K.: Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiology Methods* 2006, vol. 67, 310-320.
- [91] Rudi K., Moen B., Drømtorp S. M., Holck L.: Use of Ethidium Monoazide and PCR in Combination for Quantification of Viable and Dead Cells in Complex Symplex. *Applied Environmental Microbiology* 2005, vol. 71, 1018-1024.
- [92] Soejima, T., Iida, K., Qin, T., Taniai, H., Seki, M., Yoshida, S.: Method to detect only live bacteria during PCR amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, vol. 46, 2305-2313.
- [93] Pan, Y., Breidt, F., (2007) *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 8028-8031.
- [94] Nocker A., Camper A. K.: Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Applied Environmental Microbiology*, 2006, vol. 72, 1997-2004.
- [95] DeTraglia M. C., Brand J. S., Tometsko M.: Characterization of azidobenzamidines as photoaffinity labeling for trypsin. *Journal of Biological Chemistry* 1978, vol. 253, 1846-1852.
- [96] Biotium Products. [online, cit. květen 2011] http://www.biotium.com/product/product_types/search/price_and_info.asp?item=40013

- [97] Nogva, H. K., Dromtorp, S. M., Nissen, H., Rudi, K.: Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *PCR BioTechniques*, 2003, vol. 34, 810-812.
- [98] Nocker, A., Sossa, K. E., Camper, A. K.: Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of Microbiology Methods*, 2007, vol. 70, 252-260.
- [99] García-Cayuela, T., Tabasco, R., Peláez, C., Reguena, T.: Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using PMA and real-time PCR. *International Dairy Journal*, 2009, vol.19, 405-409.
- [100] Oficiální stránky SanyDuo. [Online, cit. prosinec 2009], <http://www.sany.com.tr/de/urunler2.php>
- [101] Oficiální stránky Ministerstva vnitra, ČR, 2011, *Vyhláška Ministerstva zemědělství č.77/2003 Sb. ve znění pozdějších předpisů*, <http://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/>.
- [102] Dubernet S., Desmaures N., Guéguen M.: A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*. 2002, vol. 214, 271-275.
- [103] Haarman, M., Knol, J.: Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied of Environmental Microbiology*. 2006, vol. 72, 2359-2365.
- [104] Greisen, k., Loeffelholz, M., Purohit, A., Leong, D.: PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, vol. 32, 335-351.
- [105] Majhenič A. Č., Matijašić B. B., Rogelj I.: Chromosomal location of the genetic determinants for bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. *Journal of Dairy Research* 2003, vol. 7, 199-203.
- [106] Wu, X.Y., Walker, M. J., Hornitzky, M., Chin., J.: Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, vol. 64, 107-119.
- [107] Rittich, B., Španová, A., Horák, D., Beneš, M. J., Klesnilová, L., Petrová, K., Rybníkář, A.: Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2006, vol. 52, 143-148.
- [108] Eskilsson, K., Leal, C., Lindman, B., Miguel, M., Nylander, T.: DNA-surfactant complexes at solid surfaces. *Langmuir* 2001, vol. 17, 1666-1669.
- [109] Trachtová, Š., Španová, A., Rittich, B.: Identification of viable *Lactobacillus* cells in fermented dairy products. *Chemické listy*, vol. 102, 805-806.
- [110] Vega, C. A., Butler, R. A., Perez, B., Torres, C.: *J. Chem. Eng. Data*. 1985, vol. 30, 376.
- [111] Horák, D., Rittich, B., Španová, A.: Carboxyl-functionalized magnetic microparticle carrier for isolation and identification of DNA in dairy products. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007, vol. 311, 249-254.
- [112] Lleó, M. M., Bonato, B., Tafi, M. C., Signoretto, C., Boaretti, M., Canepari, P.: Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, vol. 91, 1095-1102.

PŘÍLOHY

12 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ABNC	živé, ale nekultivovatelné buňky
A-DNA	prostorová konformace DNA (pravotočivá)
ARDRA	metoda restrikční analýzy amplifikované ribozomální DNA
B-DNA	prostorová konformace DNA (pravotočivá)
bp	páry bází
BPO	dibenzoylperoxid
CAB	acetát-butyrát celuloza
CCDM	z angl. <i>Culture Collection of Dairy Microorganisms</i>
CCM	z angl. <i>Czech Collection of Microorganisms</i>
cDNA	chromosomální DNA
cfu	z angl. <i>colony forming units</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2' - deoxyribonukleotid-5' -trifosfát
dsDNA	dvoušroubovice DNA
EDMA	ethylendimethakryát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EMA	ethyidium monoazid
EMA-PCR	metoda rozlišení živých a mrtvých buněk (ethidium monoazid polymerázová řetězová reakce)
GMA	glycidylmethakrylát
HEMA	hydroxyethylmethakrylát
HRM	vysoce citlivá analýza tání PCR produktů
IDA	iminodiotová kyselina
IMS	imunomagnetická separace
IMS-PCR	imunomagnetická separace spojená s polymerázovou řetězovou reakcí
$\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$	manganatý peroskvit
LMSO	manganatý peroskvit pokrytý vrstvou silikagelu
M	směrnice amplifikačních křivek
MBAAm	methylenbisakrylamid
MIPA	magnetic immuno PCR assay (IMS-PCR)
MRI	magnetické rezonanční zobrazování
mRNA	mediátorová RNA
NCBI	Národní centrum pro biotechnologické informace
NK	nukleová kyselina
OD	optická denzita (absorbance při vlnové délce 600 nm)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDI	index polydispersity
PEG	polyethylenglykol

PGMA	poly(glycidylmethakrylát)
P(GMA)NH ₂ -STV	streptavidinem funkcionalizované polyglycidylmethakrylátové nosiče
P(HEMA)	poly(2-hydroxyethylmethakrylát)
P(HEMA- <i>co</i> -EDMA)	poly(hydroxyethylmethakrylát-co-ethylendimethakrylát)
P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	poly(hydroxyethylmethakrylát-co-glycidylmethakrylát)
PMA	propidium monoazid
PMA-PCR	metoda rozlišení živých a mrtvých buněk (propidium monoazid polymerázová řetězová reakce)
PMMA	poly(methylmethakrylát)
P(NIPAAm)	poly(<i>N</i> -isopropylakrylamid)
PS	polystyren
qPCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
R ²	korelační koeficient lineární regrese
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
SPRI	reversibilní extrakce na pevné fázi
ssDNA	jednovláknová DNA ssRNAjednovláknová RNA
TEOS	tetraethoxysilan
T _m	teplota tání (melt temperature)
T _c	Curieova teplota
TMAH	hydroxid tetramethyl amonný
VPTT	teplota fázového přechodu
Z-DNA	prostorová konformace DNA (levotočivá)

13 STRUČNÝ ŽIVOTOPIS AUTORA

JMÉNO: Štěpánka Trachtová
DATUM NAROZENÍ: 16.2.1983
MÍSTO NAROZENÍ: Český Krumlov
NÁRODNOST: česká
TRVALÉ BYDLIŠTĚ: Ve Stržném 319, 391 11 Planá nad Lužnicí

VZDĚLÁNÍ

- 2007- současnost Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií.
Student doktorského studijního programu Chemie a technologie potravin, obor Potravinářská chemie.
Téma disertační práce: Studium reversibilní adsorpce nukleových kyselin na pevných nosičích.
Školitel: doc.Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
Předpokládaný termín obhajoby: září 2011
- 2007- současnost Doplnující pedagogické studium, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta stavební, Ústav společenských věd
- 2002-2007 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií.
Inženýrský studijní program Chemie a technologie potravin, obor Potravinářská chemie a biotechnologie.
Téma diplomové práce: Studium biodegradace lignocelulózových materiálů.
- 1998-2002 SOŠ pro ochranu a tvorbu životního prostředí Veselí nad Lužnicí
Obor: Analýza potravin

ZAHRANIČNÍ STUDIJNÍ STÁŽE ABSOLVOVANÉ V PRŮBĚHU DOKTORSKÉHO STUDIA

- 2009 studijní stáž na Universitě Pannonia, Veszprem, Maďarsko
2008 studijní stáž na Universitě v Ljublaně, Biotechnologická fakulta, Ústav Zootechniky, Domžale, Slovinsko

STUDIJNÍ KURZY ABSOLVOVANÉ V PRŮBĚHU DOKTORSKÉHO STUDIA

- 2011 Metody molekulární biologie proteinu a proteomiky, MENDELU, Brno
2010 Kurz základů vědecké práce, Akademie věd České republiky, Brno
studijní pobyt na Ústavu makromolekulární chemie Akademii věd v Praze pod vedením Ing. D. Horáka
Letní škola molekulární biologie nukleových kyselin, MENDELU, Brno

OCENĚNÍ A SOUTĚŽE

- 2010 Studentská odborná konference Chemie a společnost, první místo v sekci doktorských studijních programů. Téma: Lanthanum Manganese Peroxide Nanoparticles for Molecular Diagnostic Application

PEDAGOGICKÁ AKTIVITA

- 2010-2011 Účast na projektu stáží studentů SŠ na VŠ a ústavech akademie věd v rámci Jihomoravského centra pro mezinárodní mobilitu. Téma stáže: Identifikace mikroorganismů v potravinách mikrobiologickými a molekulárně diagnostickými metodami
2010-2011 Výuka předmětu Praktikum z molekulární biotechnologie, VUT v Brně, Fakulta chemická
2009-2010 Výuka předmětu Praktikum z bioanalytických metod, VUT v Brně, Fakulta chemická

GRANTY

- 2009-2010 Hlavní řešitel grantového projektu Fondu rozvoje Vysokých škol - Moderní genetické diagnostické metody v molekulární biotechnologii.

14 SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

Publikace v časopisech s impakt faktorem

TRACHTOVÁ, Š.; KAMAN, O.; ŠPANOVA, A.; VEVERKA, P.; POLLERT, E.; RITTICH, B. Silica coated $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ nanoparticles for magnetically driven DNA isolation. *Journal of Separation Science*. 2011 (přijato k publikaci). (IF 2,631)

RITTICH, B.; ŠPANOVA, A.; ŠÁLEK, P.; NĚMCOVÁ, P.; TRACHTOVÁ, Š.; HORÁK, D. Separation of PCR-ready DNA from dairy products using magnetic hydrophilic microspheres and poly(ethyleneglykol) - NaCl water solutions. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2009, 321, 10, 1667-1670. ISSN: 0304- 8853. (IF 1,204)

TRACHTOVÁ, Š.; ŠPANOVA, A.; RITTICH, B. Identification of viable *Lactobacillus* cells in fermented dairy products. *Chemické listy*, 2008, 102, 15, 805-806. ISSN: 1213- 7103. (IF 0,683)

ŠPANOVA, A.; TYCOVÁ, M.; TRACHTOVÁ, Š.; RITTICH, B. Identification of bacterial strains of *Streptococcus thermophilus* species using PCR. *Chemické listy*, 2008, 102, 15, 793-794. ISSN: 1213- 7103. (IF 0,683)

Publikace v časopisech bez impakt faktoru

TRACHTOVÁ, Š.; RITTICH, B. Izolace DNA z mléčných a probiotických výrobků pomocí magnetických mikronosičů. *Mlékařské listy – Zpravodaj*, Praha, Výzkumný ústav mlékárenský v Praze, 2011, 22, 126, VII – X. ISSN 1212-950X,

ILLKOVÁ, K.; TRACHTOVÁ, Š.; ŠPANOVA, A.; RITTICH, B. PCR identification of *Bacillus* strains from a complex sample. In *Book of full papers*. Bratislava: Food Research Institute, 2010, 243-248. ISBN: 978-80-89088-89-8.

Přednášky

TRACHTOVÁ, Š. Využití magnetických nanonosičů pro izolaci DNA z probiotických mléčných výrobků. Praha ČZU, 2011.

TRACHTOVÁ, Š. Lanthanum Manganese Peroxide Nanoparticles for Molecular Diagnostic Application .Brno: Studentská Odborná Konference Chemie a Společnost, VUT v Brně, 2010.

TRACHTOVÁ, Š.; ŠPANOVA, A.; RITTICH, B. Identifikace živých buněk *Lactobacillů* v kysaných mléčných výrobcích. Praha: ČZU v Praze, 2010.

RITTICH B., TURKOVÁ K., TRACHTOVÁ Š., DRÁB V., ŠPANOVA A., RADA V. Charakterizace potenciálně probiotických bakterií rodu *Lactobacillus* lidského původu ze sbírky Laktoflora. Praha: Setkání české mlékařské společnosti, 2010.

Sdělení na zahraničních konferencích

RITTICH, B.; ŠPANOVA, A.; TRACHTOVÁ, Š.; ŠÁLEK, P.; HORÁK, D. Magnetic and nonmagnetic particles for biotechnological applications. *11th International Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials*, Pretoria. Pretoria - South Africa: 2011. s. 294-294. ISBN: 978-1-86854-946- 7

ŠPANOVA, A.; TRACHTOVÁ, Š.; RITTICH, B. Application of real- time PCR for evaluation of magnetic nanoparticles in molecular diagnostics. *11th International Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials*, Pretoria. Pretoria - South Africa: 2011. ISBN: 978-1-86854-946- 7.

RITTICH, B., TRACHTOVÁ, Š., ŠPANOVA, A., KAMAN, O., POLLERT E. HORÁK, D. Nano- and microparticles for molecular diagnostic applications. In Bologna: Dechema, 2010, B2004 (B2004 s.) 2009

ŠPANOVÁ, A.; TRACHTOVÁ, Š.; TVRDÍKOVÁ, J.; HORÁK, D.; RITTICH, B. Reversible DNA adsorption on the surfaces of different magnetic nano- and microspheres. 6th International Conference on Materials Structure and Micromechanics of Fracture. Brno: VUTIU, Brno, 2010. s. 152-152. ISBN: 978-80-214-4112- 5

RITTICH, B., ŠPANOVÁ, A., TRACHTOVÁ, Š., HORÁK, D. Magnetic Microspheres for DNA Diagnostics and DNA Delivery. 6th International Conference on Materials Structure and Micromechanics of Fracture. Brno: VUTIU, 2010. s. 151-151. ISBN: 978-80-214-4112- 5

TRACHTOVÁ, Š.; RITTICH, B.; ŠPANOVÁ, A.; HORÁK, D.; KUBISZ, P. Newly synthesized magnetic particles P (HEMA-co-GMA) for DNA isolation from probiotic strain *Lactobacillus gasseri* K7. *International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics Conference Proceedings*. Kysucke Nove Mesto, Slovak Republic: Pamida International Ltd., 2010, 158-158. ISBN: 978-80-970168-4- 5.

ILLKOVÁ, K.; ŠPANOVÁ, A.; TRACHTOVÁ, Š.; RITTICH, B. PCR Identification of *Bacillus* strains from commercial product and its application to the wastewater. Book of Abstracts. Bratislava: Food Research Institute, 2010. s. 176-176. ISBN: 978-80-89088-90- 4.

ILLKOVÁ, K.; TRACHTOVÁ, Š.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B. PCR and ARDRA Differentiation of Related Species of *Bacillus*. *Conference Proceedings*. Kysucke Nove Mesto: Pamida International Ltd., 2010, 120-121. ISBN: 978-80-970168-4- 5.

TRACHTOVÁ, Š.; OBERMAJER, T.; SPANOVA, A.; MATIJASIC, B. B.; ROGELJ, I.; HORAK, D.; RITTICH, B. Application of magnetic carriers for whole DNA isolation and detection of probiotic *Lactobacillus gasseri* K7 strain in complex samples. *Gastro jenterologia*, 2009, 11, 4, A27 (A28 s.) ISSN: 1727- 7906.

OBERMAJER, T., BOGOVIC MATIJASIC, B., TRACHTOVA, S., SPANOVA, A., ROGELJ, I.: Evaluation of four methods of DNA extraction from mouse faeces using *Lactobacillus gasseri* K7 specific real- time PCR. 3rd Congress of European microbiologists, Gothenberg, Sweden, 2009, 33-34.

RITTICH, B.; ŠPANOVÁ, A.; SYSLOVÁ, I.; TRACHTOVÁ, Š.; HORÁK, D. Hydrophilic magnetic nonporous microspheres for bacterial DNA isolation. *New Biotechnology*, 2009, 25, 1, S186 (S186 s.) ISSN: 1871- 6784. (IF 2,00)

TRACHTOVÁ, Š.; OBERMAJER, T.; SPANOVA, A.; MATIJASIC, B. B.; ROGELJ, I.; HORAK, D.; RITTICH, B. Magnetic hydrophilic microspheres P(HEMA-co-GMA) for DNA isolation from mouse faeces. 4th International Symposium on RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS. Praha: 2009, 259. ISBN: 978-80-7080-726- 2.

RITTICH, B.; ŠPANOVÁ, A.; ŠÁLEK, P.; TRACHTOVÁ, Š.; HORÁK, D. Application of Aqueous Phase System and Hydrophilic Magnetic Microspheres for Isolation of Bacterial PCR- ready DNA from Dairy Products. *Proceedings of 7th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*. Vancouver, Canada: Universit of British Columbia, 2008, 202-202.

TRACHTOVÁ, Š.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B. Optimization of polymerase chain reaction for detection of live and dead probiotic lactobacillus cells. In *Proceedings o International Probiotic Conference*, ISSN 1336- 863X. Košice, Slovenská Republika: Univerzita P.J. Šafárika, 2008, 55.

Sdělení na tuzemských konferencích

TRACHTOVÁ, Š. Identification of viable lactobacillus cell in fermented dairy products. In *Sborník přednášek V. symposia společnosti pro probiotika a prebiotika*. Praha: ČZU v Praze, 2010, 16-16. ISBN: 978-80-213-2072- 7.

TRACHTOVÁ, Š.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B. Využití magnetických nanonosičů pro izolaci DNA z probiotických mléčných výrobků. Sborník přednášek VI. Symposia Společnosti pro probiotika a prebiotika. Praha, Česká republika: ČZU v Praze, 2011. s. 12-12. ISBN: 978-80-213-2173- 1.

ŠPANOVÁ, A.; ZOVČÁKOVÁ, M.; BALOGOVÁ, P.; TRACHTOVÁ, Š.; RITTICH, B. Identifikace probiotických bakterií s doplňcích stravy s využitím PCR. Sborník přednášek VI. Sympozia Společnosti pro probiotika a prebiotika. Praha, Česká republika: ČZU v Praze, 2011. ISBN: 978-80-213-2173- 1.

TRACHTOVÁ, Š.; BOGOVIC MATIJASIC B.; ROGEJL,I.; OBERMAJER, T.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH,B. Využití magnetických hydrofilních mikronosičů P(HEMA-co-GMA) při identifikaci probiotického kmene *Lactobacillus gasseri* K7 ve stolici myši. *XIII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Sborník příspěvků*. Brno: Masarykova universita, 2009, 97-97. ISBN: 978-80-210-4830- 0.

TRACHTOVÁ, Š.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B. Využití PCR při rozlišení živých a mrtvých bakteriálních buněk. In *XII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů*. Brno: Masarykova univerzita, Brno, 2008, 10. ISBN: 978-80-210-4526- 2.

ŠÁLEK, P.; TRACHTOVÁ, Š.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B. Optimalizace reverzibilní adsorbce vysokomolekulární DNA na magnetické nosiče. *XII. Setkání biochemiků a molekulárních biologů*. Brno: Masarykova univerzita, Brno, 2008, 101-101. ISBN: 978-80-210-4526- 2.

15 PLNÉ ZNĚNÍ VYBRANÝCH PUBLIKACÍ

1. RITTICH, B.; ŠPANOVÁ, A.; ŠÁLEK, P.; NĚMCOVÁ, P.; TRACHTOVÁ, Š.; HORÁK, D. Separation of PCR-ready DNA from dairy products using magnetic hydrophilic microspheres and poly(ethyleneglykol) - NaCl water solutions. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2009, 321, 10, 1667-1670. ISSN: 0304- 8853.
2. TRACHTOVÁ, Š.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B. Identification of viable *Lactobacillus* cells in fermented dairy products. *Chemické listy*, 2008, 102, 15, 805-806. ISSN: 1213- 7103.
3. ILLKOVÁ, K.; TRACHTOVÁ, Š.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B. PCR identification of *Bacillus* strains from a complex sample. In *Book of full papers. Bratislava: Food Research Institute*, 2010, 243-248. ISBN: 978-80-89088-89- 8.
4. TRACHTOVÁ, Š.; RITTICH, B. Izolace DNA z mléčných a probiotických výrobků pomocí magnetických mikronosičů. *Mlékařské listy – Zpravodaj*, Praha, Výzkumný ústav mlékárenský v Praze, 2011, 22, 126, VII – X. ISSN 1212-950X.
5. TRACHTOVÁ, Š.; KAMAN, O.; ŠPANOVÁ, A.; VEVERKA, P.; POLLERT, E.; RITTICH, B. Silica coated $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ nanoparticles for magnetically driven DNA isolation. *Journal of Separation Science*. 2011 (v červenci 2011 přijato k publikaci).



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Magnetism and Magnetic Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmmm

Separation of PCR-ready DNA from dairy products using magnetic hydrophilic microspheres and poly(ethylene glycol)–NaCl water solutions

Bohuslav Rittich^{a,b,*}, Alena Španová^{a,b}, Petr Šálek^b, Petra Němcová^a, Štěpánka Trachtová^b, Daniel Horák^c^a Masaryk University, Faculty of Science, Institute of Experimental Biology, Tvrdého 14, CZ-611 37 Brno, Czech Republic^b Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Food Science and Biotechnology, Purkyňova 464/118, CZ-612 00 Brno, Czech Republic^c Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Heyrovský Sq. 2, CZ-162 06 Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Available online 28 February 2009

Keywords:

Magnetic microsphere

P(HEMA-co-GMA)

DNA isolation

Dairy product

Polymerase chain reaction (PCR)

ABSTRACT

Carboxyl group-containing magnetic nonporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) (P(HEMA-co-GMA)) and magnetic glass microspheres were used for the isolation of bacterial DNA. P(HEMA-co-GMA) microspheres were prepared by the dispersion polymerization in toluene/2-methylpropan-1-ol mixture in the presence of magnetite nanoparticles obtained by coprecipitation of Fe(II) and Fe(III) salts with ammonium hydroxide. Carboxyl groups were then introduced by oxidation of the microspheres with potassium permanganate. The most extensive DNA recovery was achieved at PEG 6000 concentrations of 12% or 16% and 2 M NaCl. The method proposed was used for bacterial DNA isolation from different dairy products containing *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* cells. The presence of target DNA and the quality of isolated DNA were checked by polymerase chain reaction (PCR) amplification with specific primers.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Polymerase chain reaction (PCR) has become a powerful diagnostic tool for the analysis of microorganisms in food samples. However, the sensitivity of PCR may be reduced when this method is applied to complex biological samples. Reduced sensitivity or false-negative results can occur in PCR identification due to the presence of extracellular PCR inhibitors in tested samples [1]. The identification of bacteria in real samples implies the following steps: preparation of PCR-ready DNA and identification of bacterial species by PCR. Pre-PCR processing procedures have been developed to reduce the effects of PCR inhibitors. The problem of pure DNA preparation can be solved by means of various isolation and purification methods:

- phenol/chloroform extraction and DNA precipitation in ethanol [2];
- chromatographic methods [3,4];
- solid phase systems non-selectively or selectively adsorbing DNA or target cells [5,6].

Solid phase systems based on silica carriers have become popular for DNA isolation [5] and are used in many available kits. Further progress was achieved by the application of magnetically responsive particles [7–9]. Magnetic particles carrying a specific antibody can be used for the capture of target cells and their separation from the environment containing extracellular inhibitors or competitive microflora. Magnetic particles need not be detached from the target microbial cells, and the immunomagnetic separation (IMS) technique can be effectively combined with PCR (IMS-PCR) [6]. The use of this technique is dependent on the availability of antibodies against target microorganisms.

A reversible DNA adsorption on the surface of particles containing carboxyl groups was used primarily for the isolation of short DNA fragments [10]. Magnetic hydrophilic 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)-based microspheres were used with success for the isolation of high-molecular-weight bacterial DNA [8,9] from different real samples in the presence of poly(ethylene glycol) (PEG) 6000 and NaCl water solutions. The authors [11] recently published a paper on the PEG–KF–water system. An equilibrium diagram for NaCl has not been reported yet.

The aim of this work was the isolation of whole PCR-ready DNA from dairy products containing *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* cells by magnetic hydrophilic poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) (P(HEMA-co-GMA)) microspheres in the

* Corresponding author at: Masaryk University, Faculty of Science, Institute of Experimental Biology, Tvrdého 14, CZ-611 37 Brno, Czech Republic.
Tel.: +420549496752.

E-mail address: rittich@sci.muni.cz (B. Rittich).

presence of water solutions composed of 2 M NaCl and PEG 600 or PEG 6000.

2. Methods

2.1. Chemicals, microorganisms, samples, and equipment

Agarose was purchased from Serva (Heidelberg, Germany), ethidium bromide from Sigma (St. Louis, USA). Magnetite (ferrous–ferric oxide Fe_3O_4 , 10 nm) was precipitated from an aqueous solution of FeCl_3 and FeCl_2 with ammonium hydroxide and stabilized by oleic acid [12]. Monomers, 2-hydroxyethyl and glycidyl methacrylate (HEMA and GMA), both from Röhm (Darmstadt, Germany), were purified by distillation under reduced pressure in nitrogen atmosphere. The stabiliser, cellulose acetate butyrate, was a kind gift of Eastman (Kingsport, USA). The primers for PCR were synthesised by Generi-Biotech (Hradec Králové, Czech Republic); TaqI DNA polymerase was from Bio-Tech (Prague, Czech Republic); DNA marker 100 bp ladder (100–1500 bp long DNA fragments) for gel electrophoresis was from Malamité (Moravské Prusy, Czech Republic); PEG 600 and PEG 6000 were purchased from Sigma (St. Louis, USA). Microbial DNA was isolated from cell lysates. Other chemicals and solvents were of analytical grade and obtained from commercial sources. Magnetic glass particles (5 μm , CPG, New York, USA) were used for the comparison of DNA isolation under the same experimental conditions.

The strain of *Bifidobacterium longum* CCM 3764 (obtained from the Czech Collection of Microorganisms, CCM, Brno, Czech Republic) was used for DNA isolation (positive control). Dairy products (yoghurt, kefir, and probiotic milk drinks) were obtained from the market.

UV measurements were carried out on a DMS 100 spectrophotometer (Varian, Mulgrave, Australia). Magnetic microspheres were separated on an MPC-M magnetic particle concentrator, Dynal (Oslo, Norway). The PCR reaction mixture was amplified on a MJ Research Programme Cycler PTC-100 (Watertown, USA). Agarose gel electrophoreses were carried out using a 3000 Xi power supply (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA). The PCR products were visualised on an UV transilluminator EB-20E from UltraLum (Paramount, USA), and photographed with a CD 34 Polaroid Camera (Polaroid, Cambridge, USA).

2.2. Preparation of microspheres

Magnetic nonporous P(HEMA-co-GMA) (50/50 w/w) microspheres were prepared by cellulose acetate butyrate-stabilised and dibenzoyl peroxide-initiated dispersion copolymerisation of 2-hydroxyethyl and glycidyl methacrylate in toluene/2-methylpropan-1-ol mixture in the presence of colloidal oleic acid-coated magnetite (Fe_3O_4) particles as described earlier [12]. Subsequently, the hydroxy groups of the microspheres were oxidised with a 2% aqueous solution of potassium permanganate under acidic conditions (2 M sulphuric acid) yielding 0.85 mM COOH/g [13]. The content of carboxyl groups in the microspheres was determined by titration using 0.1 M NaOH on a 799 GPT Titrino (Metrohm, Herrisau, Switzerland) after ion exchange with a 10% aqueous solution of BaCl_2 [14]. The microspheres were of 2.2 μm size with a rather narrow size distribution characterised by a polydispersity index, $\text{PDI} = 1.1$ ($\text{PDI} = D_w/D_n$, where D_w and D_n is the weight- and number-average particle diameter, respectively, determined from the measurement of at least 500 microspheres on scanning electron micrographs).

2.3. Cell cultivation, DNA isolation, and PCR amplification

Bacterial cells of *Bifidobacterium longum* were cultivated anaerobically on MRS medium (Oxoid, Great Britain) with cysteine (0.5 g/l) overnight (18 h) at 37 °C. Altogether 1 ml of the cells was washed and resuspended in 500 μl lysis buffer (10 mM Tris–HCl, 5 mM EDTA (pH 7.8) containing lysozyme (3 mg/ml) and incubated at 22 °C for 1 h; 10 μl proteinase K (1 mg/ml) and 2.5 μl SDS (20%) was then added and the mixture was incubated at 55 °C for 18 h. DNA was extracted from crude cell lysates with phenol [2] or separated using the magnetic microspheres. The integrity of nucleic acid was confirmed by gel electrophoresis and the purity of DNA was determined by UV spectrophotometry. The ratio $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ was used as a test of nucleic acid purity [15].

Dairy products (1 g) were dispersed in 1 ml of water. Bacterial cells were sedimented (10,000 g/5 min), dispersed in lysis buffer, and treated as *Bifidobacterium longum* cells (see above). A total of 50 μl of crude cell lysate, 10 μl of microsphere suspension (2 mg/ml), and the appropriate amount of 40% PEG and 5 M NaCl (end concentration 4%, 8%, 12%, or 16% PEG, 2 M NaCl) were mixed and incubated for 10 min at laboratory temperature. The DNA captured on the microspheres was washed using 500 μl of 70% ethanol and eluted in 50 μl of TE buffer (10 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA; pH 7.8).

DNA purified by phenol extraction [2] or DNA isolated using the magnetic microspheres were used as DNA matrix in PCR. PCR was performed with PbiF1 and PbiR2 primers specific to the *Bifidobacterium* genus [16], which enabled the amplification of 914 bp long amplicons, and LBLMA 1 and R16 primers specific to the *Lactobacillus* genus [17], which enabled the amplification of 250 bp long amplicons. Briefly, the PCR mixture contained 0.5 μl of each 10 mM dNTP, 0.5 μl (10 pmol/ μl) of each primer, 0.5 μl of Taq 1.1 polymerase (1 U/ μl), 2.5 μl of buffer (1.5 mM), 1–2 μl of DNA matrix, and PCR water was added up to a 25 μl volume. The amplification reactions were carried out using the following cycle parameters: 5 min of the initial denaturation period at 94 °C (hot start), 60 s of denaturation at 94 °C, 60 s of primer annealing at 50 °C, and 120 s of extension at 72 °C for the *Bifidobacterium* genus; 5 min of the initial denaturation period at 94 °C (hot start), 60 s of denaturation at 94 °C, 60 s of primer annealing at 55 °C, and 60 s of extension at 72 °C for the *Lactobacillus* genus, respectively. The final polymerization step was prolonged to 10 min, the number of cycles was 30. PCR products were detected using electrophoresis with 1.5% agarose in TBE buffer (45 mM boric acid, 45 mM Tris–base, 1 mM EDTA; pH 8.0). The DNA was stained with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g/ml}$), and photographed at 305 nm UV light on a TT667 film.

3. Results and discussion

The PEG–NaCl system (8% PEG 6000 and 2 M NaCl) was used in our previously published papers [8,9,13]. Condensation of DNA occurred [18] under the given experimental conditions and condensed DNA was adsorbed on the surface of solid magnetic microspheres. In this work, newly designed carboxyl group-containing magnetic hydrophilic poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) P(HEMA-co-GMA) were prepared by dispersion polymerization of both monomers in a toluene/2-methylpropan-1-ol mixture in the presence of oleic acid-coated magnetite nanoparticles. Dispersion copolymerisation was stabilized by cellulose acetate butyrate and initiated by dibenzoyl peroxide [12]. Advantage of dispersion polymerization consists in that almost monodisperse magnetic microspheres in the micrometer-size range can be obtained in a single step. At the same time, the particles are nonporous, as the dispersion polymerization involves precipitation of oligomeric chains from a solution of

monomer, initiator, and stabiliser in the presence of magnetite colloid, as no porogen is used. Introduction of carboxyl groups is important especially for subsequent attachment/immobilization of a plethora biomolecules via different chemistries. In our case, carboxyl groups were used for uniform hydrophilisation of the particle surfaces. These carboxyl-coated and magnetic glass microspheres (with silanol groups) were used for the isolation of bacterial DNA.

Various poly(ethylene glycol) (PEG 600 and/or PEG 6000) and 2 M sodium chloride concentrations were used to optimise DNA adsorption (DNA was isolated from *Bifidobacterium longum* cells by phenol extraction). The results of DNA recovery from tested microspheres are given in Table 1. The amount of purified DNA added to microspheres was taken as 100%. The recovery for solutions with PEG 6000 was higher than for PEG 600. From this reason, the next experiments were carried out with PEG 6000. The most extensive DNA recovery was achieved at PEG 6000 concentrations of 12% or 16% and 2 M NaCl. The method developed was applied for isolation of PCR-ready DNA from crude cell lysates (without phenol extraction procedure) from different fermented dairy products, such as yoghurt, probiotic milk drinks, kefir. The results of PCR performed with primers specific to the *Bifidobacterium* genus are given in Fig. 1A. Phenol extraction was used as a positive control. The amount of eluted DNA from the microspheres was sufficient for PCR identification of tested strains. The sensitivity was usually lower than in the case of DNA isolated by the phenol extraction method probably due to the lower amount of target DNA in eluates of PEG–NaCl procedure in comparison with phenol extraction (see Table 1). The intensity of PCR products was higher in the case of silica particles probably due to the lower active surface of nonporous P(HEMA-co-GMA) microspheres. The same procedure was used for DNA isolation from a second set of dairy products (probiotic milk drink (I), (II), kefir, and yoghurt) and identification of *Lactobacillus* cells by PCR with primers specific to this genus. The results are given in Fig. 1B. The most intensive PCR products were detected with DNA isolated if 16% PEG 6000 and 2 M NaCl were used. More intensive PCR products were obtained if PEG 6000 was used in contrast to PEG 600 (compare with results in Table 1).

The following influences in the process of DNA isolation can be taken into consideration. It is known that PEG adsorbs on the silica surface through hydrogen bonding with surface silanol groups [19]. Poly(ethylene glycol)-covered surfaces have been widely used as passivation layers to avoid non-specific adsorption

Table 1
Recovery of bacterial DNA (%) from *Bifidobacterium longum* cells.

PEG (Mw)	PEG ^a (% w/w)	Magnetic microspheres	Recovery (%)
600	4	P(HEMA-co-GMA)	5.1
		Magnetic glass	5.2
	8	P(HEMA-co-GMA)	4.8
		Magnetic glass	7.2
	12	P(HEMA-co-GMA)	8.5
		Magnetic glass	5.9
	16	P(HEMA-co-GMA)	7.2
		Magnetic glass	4.7
6000	4	P(HEMA-co-GMA)	6.4
		Magnetic glass	6.7
	8	P(HEMA-co-GMA)	5.5
		Magnetic glass	8.0
	12	P(HEMA-co-GMA)	9.2
		Magnetic glass	10.3
	16	P(HEMA-co-GMA)	8.6
		Magnetic glass	9.4

^a The end concentration of NaCl was 2 M.

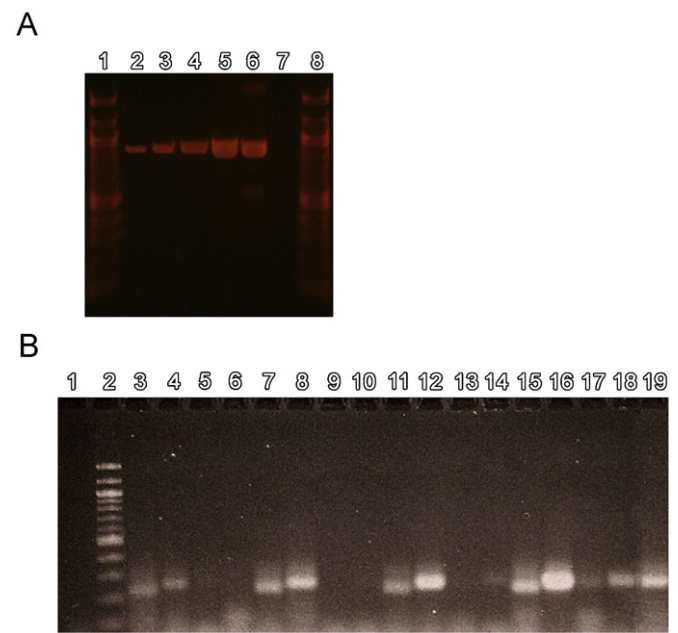


Fig. 1. Agarose gel after electrophoresis of PCR products obtained after amplification of (A) *Bifidobacterium* DNA isolated from yoghurt sample and (B) *Lactobacillus* DNA isolated from dairy products. Conditions: 1.5% agarose gel, TBE buffer (45 mM boric acid, 45 mM Tris-base, 1 mM EDTA, pH 8.0). (A): Lanes 1,8: DNA standard (100 bp ladder), lane 2: DNA isolated using P(HEMA-co-GMA) magnetic microspheres in the presence of PEG 6000–NaCl water solutions (8% PEG 6000, 2 M NaCl), lane 3: DNA isolated using P(HEMA-co-GMA) magnetic microspheres and 16% PEG 6000, 2 M NaCl water solutions, lane 4: DNA isolated using magnetic glass particles and 8% PEG 6000, 2 M NaCl water solutions, lane 5: DNA isolated using magnetic glass particles and 16% PEG 6000, 2 M NaCl water solutions, lane 6: positive control—phenol extraction procedure (1 ng of *Bifidobacterium* DNA), lane 7: negative control (without DNA). (B) DNA was isolated using P(HEMA-co-GMA) microspheres. Lane 1: negative control, lane 2: DNA standard (100 bp ladder), DNA isolated from probiotic dairy products: lanes 3–6: PEG 600 (8%), 2 M NaCl, samples A, B, C, D; lanes 7–10: PEG 600 (16%), 2 M NaCl, samples A, B, C, D; lanes 11–14: PEG 6000 (8%), 2 M NaCl, samples A, B, C, D; lanes 15–18: PEG 6000 (16%), 2 M NaCl, samples A, B, C, D; lane 19: positive control (1 ng of *Lactobacillus* DNA). Samples: A—probiotic milk drink (I), B—probiotic milk drink (II), C—kefir, and D—yoghurt.

of proteins [20]. The surface protein concentration decreased as the concentration of grafted PEG increased, but surface protein never reached zero value [20]. At high PEG concentrations, PEG can bind to hydrophobic sites of proteins [21] based on the fact that PEG is essentially non-polar. Depending on the magnitude of these interactions, phase separation (precipitation) between proteins and solvents may occur [22]. Similar adsorption of PEG on surface of microspheres containing carboxyl groups can be expected.

The mechanism of DNA interaction with the microsphere surface is evidently complicated in the presence of high concentrations of both PEG and NaCl. There is little information on adsorption of condensed DNA in the presence of PEG and NaCl solutions. The authors [23] suppose that adsorption of condensed DNA on hydrophobised silica surface is accompanied by structural changes in the helices and more hydrophobic bases are available to interact with the hydrophobic surface. In analogy with the above-mentioned finding, it is possible to assume that nitrogen bases of DNA in collapsed state interact via electrostatic interaction with the surface of magnetic P(HEMA-co-GMA) and magnetic glass microspheres which are coated with PEG. It is supposed that negatively charged phosphate groups do not significantly influence the interactions.

The results presented here show that DNA was isolated in a quality suitable for amplification in PCR. The method proposed is

faster and easier than the more tedious phenol extraction of DNA (which can be omitted).

4. Conclusion

Various aqueous phase systems based on PEG 600 and/or PEG 6000 and 2 M NaCl were tested to optimise DNA adsorption. DNA was apparently adsorbed on magnetic hydrophilic P(HEMA-co-GMA) microspheres and magnetic glass particles. The most extensive DNA recovery and the highest PCR product intensities were achieved at PEG 6000 concentrations of 12% or 16% and 2 M NaCl. The results presented here show that the method proposed is suitable for the isolation and purification of bacterial DNA from crude cell lysates. The method developed was applied to analysis of bacterial DNA in real dairy products.

Acknowledgements

The financial support of the National Grant Agency for Agricultural Research (NAZV), Grants nos. 1G57037 and 1G58097, and a long-term research programme MSM 0021622415 of the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic is gratefully acknowledged. We thank Mr. Ladislav Červený for his kind language revision.

References

- [1] G. Wilson, Appl. Environ. Microbiol. 63 (1997) 3741.
- [2] J. Sambrook, D.W. Russel, Molecular Cloning, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- [3] K. Kasai, J. Chromatogr. 618 (1993) 203.
- [4] L.Z. Li, Y. Liu, M.S. Sun, Y.M. Shao, J. Chromatogr. A 1139 (2007) 228.
- [5] K.A. Melzak, Ch.S. Sherwood, R.F.B. Turner, Ch.A. Haynes, J. Colloid Interface Sci. 181 (1996) 635.
- [6] A. Španová, B. Rittich, D. Horák, et al., J. Chromatogr. A 1009 (2003) 215.
- [7] I.J. Bruce, J. Taylor, M. Todd, et al., J. Magn. Magn. Mater. 284 (2004) 145.
- [8] B. Rittich, A. Španová, D. Horák, et al., Colloids Surf. B: Biointerfaces 52 (2006) 143.
- [9] A. Španová, B. Rittich, I. Štyriak, et al., J. Chromatogr. A 1130 (2006) 115.
- [10] T.L. Hawkins, T. Oconnor-Morin, A. Roy, C. Santillan, Nucleic Acids Res. 21 (1994) 2543.
- [11] G.M.F. Brass, S.G. Walker, A. Lyddiatt, J. Chromatogr. B 743 (2000) 409.
- [12] D. Horák, N. Semenyuk, F. Lednický, J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed. 41 (2003) 1848.
- [13] J. Křížová, A. Španová, B. Rittich, D. Horák, J. Chromatogr. A 1064 (2005) 247.
- [14] H. Dautzenberg, B. Philipp, Faserforsch. Textiltech. 25 (1974) 469.
- [15] R.R. Sinden, DNA Structure and Function, Academic Press, San Diego, 1994, p. 34.
- [16] D. Roy, S. Sirois, FEMS Microbiol. Lett. 191 (2000) 17.
- [17] S. Dubernet, N. Desmases, M. Guéguen, FEMS Microbiol. Lett. 214 (2002) 271.
- [18] V.V. Vasilevskaya, A.R. Khokhlov, Y. Matsuzawa, K. Yoshikawa, J. Chem. Phys. 102 (1995) 6595.
- [19] T. Arakawa, S.N. Timasheff, Biochemistry 24 (1985) 6756.
- [20] R. Michel, S. Pasche, M. Textor, D.G. Caster, Langmuir 21 (2005) 12327.
- [21] L.L.-Y. Lee, J.C. Lee, Biochemistry 26 (1987) 7813.
- [22] T. McPherson, A. Kidane, I. Szleifer, K. Park, Langmuir 14 (1998) 176.
- [23] K. Eskilsson, C. Leal, B. Lindman, M. Miguel, T. Nylander, Langmuir 17 (2001) 1666.

P101 IDENTIFICATION OF VIABLE LACTOBACILLUS CELLS IN FERMENTED DIARY PRODUCTS

ŠTĚPÁNKA TRACHTOVÁ, ALENA ŠPANOVÁ and
BOHUSLAV RITTICH

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Department of Food Chemistry and Biotechnology
Purkyňova 118, 612 00 Brno
trachtova@fch.vutbr.cz

Introduction

Lactobacillus and *Bifidobacterium* species are commonly found in foods and are members of the gastrointestinal tract of humans and animals. They are the most commonly used group of lactic acid bacteria (LAB) in the production of human probiotics. Methods for qualitative and quantitative control of probiotic products are required due to the growing interest in their commercial exploitation. Differentiation of viable and non-viable cells of LAB from a product is still problematic. Culture-dependent enumeration is relatively time-consuming and the results may be influenced by poor viability or low densities of the target organisms¹. Rapid and reliable methods are needed for routine determination of initial cell counts in the inoculum or for viable cell estimation during the time period of storage. Therefore, culture-independent analysis as an alternative and/or complementary method for quality control measurements of probiotic products was developed. The combination of PCR and the ethidium monoazide (EMA-PCR) dye is a new method for selective distinction between viable and dead bacterial cells^{2–4}. The general application of EMA is based on EMA penetration into dead cells with compromised cell-membrane (cell-wall) integrity. EMA is covalently linked to DNA by photoactivation and this DNA cannot be amplified in PCR. Viable cells remain intact and only DNA from these cells can be amplified and gives a PCR product.

The aim of this work was to optimise and use EMA-PCR for distinction between viable and dead *Lactobacillus* cells in real samples of dairy products (yoghurts).

Materials and Methods

Chemicals and Equipment

The primers for PCR were synthesised by Generi-Biotech (Hradec Králové, Czech Republic); *TaqI* DNA polymerase was from Bio-Tech (Prague, Czech Republic); DNA ladder 100 bp (Malamité, Moravské Prusy), and EMA from Sigma (St. Louis, USA). The *Lactobacillus paracasei* CCDM strain (obtained from the Czech Collection of Dairy Microorganisms, CCDM, Tábor, Czech Republic) was used for DNA isolation. The dairy products (white yoghurts before and after expiration date) were obtained from the market. The PCR reaction mixture was amplified on an MJ Research Programme Cycler PTC-100 (Watertown, USA).

Methods

Bacterial cells of *Lactobacillus paracasei* were cultivated at 37 °C aerobically in liquid MRS medium for 24 h or on MRS agar up to 48 hours, respectively. Altogether 1 ml of the cells was washed by water and resuspended in 500 µl lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM EDTA, pH 8.0, lysozyme 3 mg ml⁻¹), and incubated at laboratory temperature for 1 h; 10 µl proteinase K (1 µg ml⁻¹) and 2.5 µl SDS (20 %) (end concentration 0.5 %) was added and the mixture was incubated at 55 °C for 18 h. DNA was extracted from crude cell lysates with phenol⁵ and dissolved in TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8; 1 mM EDTA, pH 8.0). The concentration of DNA was estimated spectrophotometrically and DNA was dissolved to a concentration of 10 µg ml⁻¹.

Yoghurt samples (Klasik white yoghurt OLMA Olomouc from the trade network before and after expiration date, 1 g) was resuspended in 1 ml sterile water. The cells were washed twice with sterile water and treated with EMA (0.1 mg ml⁻¹) for 10 min at laboratory temperature. Photoactivation was performed using light exposure (halogen lamp, 500 W) for 5 minutes on ice. Then the cells were washed with 1 ml of water to remove EMA from the sample. The cells without EMA treatment were used as control. Afterwards the cells were lysed by boiling (10 min) and crude cell lysates (5 µl) were used as DNA matrix in EMA-PCR.

PCR was performed with LBLMA 1 and R16 primers specific to the *Lactobacillus* genus⁶, which enabled the amplification of a 250 bp long amplicon. Briefly: the PCR mixture contained 0.5 µl of each 10 mM dNTP, 0.5 µl (10 pmol µl⁻¹) of each primer, 0.5 µl of *Taq* 1.1 polymerase (1 U µl⁻¹), 2.5 µl of buffer (1.5 mM), 1–5 µl of DNA matrix, and PCR water was added up to a volume of 25 µl. The amplification reactions were carried out using the following cycle parameters: 5 min of the initial denaturation period at 94 °C (hot start), 60 s of denaturation at 94 °C, 60 s of primer annealing at 55 °C, and 60 s of extension at 72 °C. The final polymerisation step was prolonged to 10 min, the number of cycles was 30. The EMA-PCR products (250 bp) were detected using agarose gel electrophoresis (1.8 %) in 0.5 × TBE buffer (45 mM boric acid, 45 mM Tris-base, 1 mM EDTA, pH 8.0). The DNA was stained with ethidium bromide (0.5 µg ml⁻¹), observed on a UV transilluminator (305 nm), and photographed on a TT667 film using a Polaroid CD34 camera.

Results and Discussion

The ability of EMA to covalently bind to DNA and to inhibit PCR was confirmed using purified DNA isolated from *Lactobacillus paracasei* cells. As a result of EMA activity, DNA treated with EMA was not amplified in PCR in contrast to DNA without EMA treatment. The results are shown in Fig. 1. The method developed was applied for the discrimination of viable and dead *Lactobacillus* cells from dairy products (yoghurt). The results are shown in Fig. 2. and Table I. Non-expired or shortly expired (12 days) yoghurts contained both dead and viable *Lactobacillus* cells because intensities of EMA-PCR products amplified from EMA treated and

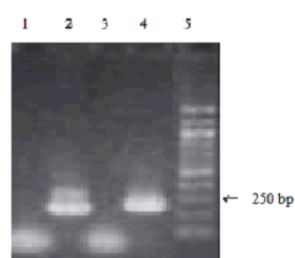


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of EMA-PCR products obtained after amplification of purified *Lactobacillus* DNA: lane 1: EMA treatment, lane 2: no EMA treatment, lane 3: negative control without DNA, lane 4: positive control with purified *Lactobacillus* DNA ($c_{\text{DNA}} = 10 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$), lane 5: DNA standard (100 bp ladder)

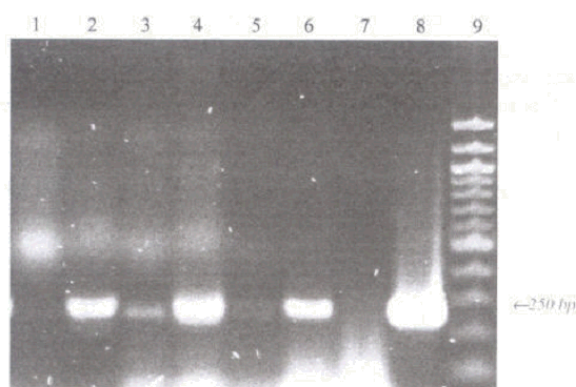


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of EMA-PCR products obtained after amplification of *Lactobacillus* DNA from yoghurt: lanes 1, 3, and 5: cells with EMA treatment, lanes 2, 4, and 6: cells without EMA treatment, lane 9: DNA standard (100 bp ladder); lanes 1 and 2: 32 days after yoghurt expiration, lanes 3 and 4: not expired, lanes 5 and 6: 12 days after yoghurt expiration, lane 7: negative control without DNA, lane 8: positive control with purified *Lactobacillus* DNA ($c_{\text{DNA}} = 10 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$)

not treated cells deferred. On the contrary, in longer expired yoghurts only dead cells were detected. This is in agreement with the presumption that non-expired yoghurt samples contain more viable cells.

Table I
Identification of viable and dead *Lactobacillus* cells in yoghurt samples

Yoghurt expiration [days]	EMA treatment	EMA-PCR product	Viability of cells
Non-expired	+	++	viable and dead
	–	+++	
12	+	+	viable and dead
	–	++	
32	+	–	dead
	–	+++	

Conclusions

The results presented here show that the method proposed (ethidium monoazide treated cells in combination with polymerase chain reaction) is suitable for the distinction of viable and dead *Lactobacillus* cells. The method developed was applied for the analysis of real dairy products (yoghurts). More viable cells were detected in non-expired yoghurt samples.

The financial support of the National Grant Agency for Agricultural Research (NAZV) grant No. 1G 57053 and a long-term research programme of the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic (MSM 0021622415) are gratefully acknowledged. We thank Mr. Ladislav Červený for his kind language revision.

REFERENCES

- Roy D.: Int. J. Food Microbiol. 69, 167 (2001).
- Rudi K., Moen B., Drømtorp S. M., Holck A. L.: Appl. Environ. Microbiol. 71, 1018 (2004).
- Lee J. L., Levin R. E.: J. Microbial Methods 67, 456 (2006).
- Soejima T., Iida K., Qin T., Taniai H., Seki M., Takade A., Yoshida S.: Microbial Immunol. 51, 763 (2007).
- Sambrook J., Russel D. W.: Molecular Cloning (3rd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- Dubernet S., Desmaures N., Guéguen M.: FEMS Microbiol. Letters 214, 271 (2002).

PCR identification of *Bacillus* strains from a complex sample

Kateřina Illková, Štěpánka Trachtová, Alena Španová, Bohuslav Rittich

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyňova 118, CZ-612 00 Brno, Czech Republic

email: xcillkova@fch.vutbr.cz; phone: +420 541149425

Abstract

In this study, bacteria of the *Bacillus* genus were identified using PCR in a commercial product (SanyDuo) used for fat degradation in industrial separators. Special attention was paid to the bacterial PCR-ready DNA isolation using nonporous magnetic P(HEMA-co-GMA) microspheres covered with carboxyl groups. Bacteria of the *Bacillus* genus were identified using PCR and selected species by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA).

Key words: *Bacillus* sp.; PCR; ARDRA; magnetic P(HEMA-co-GMA) microspheres

Introduction

The *Bacillus* genus is a member of ubiquitous endospore-forming, gram-positive bacteria of the *Firmicutes* division widely distributed in the environment. Many species (*Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*) are able to secrete large quantities of enzymes and are used industrially for the production of enzymes, antibiotics, solvents, and other molecules (1). Bacilli secreting amylases and proteases into culture media play an important role during soy food fermentations and are important sources for commercial enzymes (2, 3). Several species of the *Bacillus* genus are applicable for their lipid degradation abilities, e.g. in the treatment of polluted water from food industry, which contains non-emulsified fats and oils. For example, the commercial product SanyDuo is used for fat degradation in industrial grease separators (4). However, correct identification of some closely related species of *Bacillus* is difficult since they share many important morphological and biochemical properties. It is difficult to distinguish *B. subtilis* from closely related *B. licheniformis* or *B. amyloliquefaciens* by rRNA gene sequencing due to the lack of any significant differences in these sequences. Other genes such as *recA* (5) and *dnaJ* (6) have been employed instead of rRNA genes. Specific PCR primers were proposed for bacteria of the *Bacillus* genus identification (1). Species identification of *Bacillus* can be accomplished by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA).

The aim of this study was to develop a quick method for PCR-ready DNA extraction and *Bacillus* identification in a real sample. Newly designed carboxyl-functionalised magnetic nonporous poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) microspheres (P(HEMA-co-GMA) were used for bacterial DNA and PCR product repurification. The qualities of extracted DNA, genus and species identification were checked by PCR and ARDRA.

Materials and Methods

Chemicals

The SanyDuo product was from ACO Building Drainage, (Bedford, UK). Agarose was purchased from Serva (Heidelberg, Germany), ethidium bromide from Sigma (St. Louis, Missouri, USA). The PCR primers were synthesised by Generi Biotech (Hradec Králové, Czech Republic); *Taq* polymerase was from Top-Bio (Praha, Czech Republic), restriction endonucleases *AluI* and *TaqI* were from BioTech (Prague, Czech Republic), and the DNA marker 100 bp ladder for gel electrophoresis was from Malamitě (Moravské Prusy, Czech Republic). Magnetic nonporous P(HEMA-co-GMA) microspheres were prepared by D. Horák (Institute of Macromolecular Chemistry, Prague, Czech Republic) (7). Other chemicals and solvents were of analytical grade and were taken from common commercial sources.

Equipment

Magnetic particles were separated on an MPC-M magnetic particle concentrator Dynal (Oslo, Norway). DNA was amplified on a thermal cycler Rotorgene 6000 (Corbett Research, Mortlake, Australia). Agarose gel electrophoreses were carried out using OWL (Bio-Rad, Richmond, USA). The PCR products were visualised at 305 nm on a UV transilluminator EB-20E from UltraLum (Paramount, USA) and photographed with a digital camera. DNA concentration was estimated spectrophotometrically using the NanoPhotometer UV/VIS (Implen, München, Germany).

Bacterial strains and growth conditions

Seven species of *Bacillus* were acquired from the Czech Collection of Microorganisms (CCM, Brno, Czech Republic) and used as reference strains: *B. subtilis* CCM 1999, *B. cereus* CCM 2010^T, *B. licheniformis* CCM 2145^T, *B. circulans* CCM 1611, *B. megaterium* CCM 2037, *B. mycoides* CCM 915, *B. thuringiensis* CCM 19^T. Bacterial cells were cultivated at 30 °C aerobically in liquid MPA (Čadarský Envitek, Czech Republic) medium for 24 h. The bacteria from the commercial product were cultivated at 30 °C aerobically in the Brain Heart Infusion Medium (BHI) (HiMedia, Čadarský Envitek, Czech Republic) for 48 hours. Bacterial isolates from the commercial product were identified as *Bacillus* spp. based on Gram staining, spore-forming testing.

DNA isolation

Bacterial DNAs were isolated according to a modified method (8). Briefly: 1 ml of the bacterial cells was washed in solution (10 mM Tris-HCl, pH 7.8; 5 mM EDTA, pH 8) and resuspended in 500 µl lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8; 5 mM EDTA, pH 8, lysozyme 3 mg/ml), and incubated at laboratory temperature for 1 hour. Then, 25 µl of 10 % SDS and 5 µl proteinase K (100 µg/ml) was added and incubated at 55 °C for 24 hours.

DNA from crude bacterial lysates was isolated using carboxyl-functionalised magnetic P(HEMA-co-GMA) microspheres (2 mg/ml) in the presence of 16 % PEG 6000 and 2 M NaCl (3). Magnetic microspheres carrying adsorbed DNA were separated in a magnetic particle concentrator (15 min), the supernatant was discarded, and the particles were washed twice with 1000 µl of 70 % ethanol and dried for 10 min at 55 °C. The DNA absorbed on the particles was eluted in 100 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8; 1 mM EDTA, pH 8) at laboratory temperature for 30 min. Isolation and purification of control DNA was performed by phenol extraction according to authors (9). The concentration and the purity of isolated DNA were estimated spectrophotometrically (10).

PCR amplification and ARDRA

Two universal bacterial primers, DG74 (5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3') and RW01 (5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3'), and two genus-specific *Bacillus* spp. primers, BK1/F (5'-TCACCAAGGCAACGATGCG-3') and BK1/R (5'-CGTATTCAACGCGGCATG-3'), were used for amplification (1, 11).

PCR was carried out in a total volume of 25 µl of reaction mixtures. The PCR mixture contained 1.0 µl of 10 mM dNTP, 1.0 µl (10 pmol/µl) of each primer, 2.0 µl of Taq 1.1 polymerase (1 U/µl), 5.0 µl of PCR buffer, 2.0 µl of DNA matrix (10 ng/µl), and PCR water was added up to a volume of 25 µl. The PCR mixture for BK1/F and BK1/R primers contained 1.0 µl of 10 mM dNTP, 0.5 µl (10 pmol/ml) of each primer, 0.3 µl of Taq 1.1 polymerase (1 U/ml), 5.0 µl of PCR buffer, 1.6 mM MgCl₂, 2.0 µl of DNA matrix (10 ng/µl), and PCR water (32.7 µl) was added up to a volume of 50 µl. The amplification reactions were carried out using the following cycle parameters: 5 min of the initial denaturation period at 95 °C (hot start), 60 s of denaturation at 95 °C, 60 s of primer annealing at 63 °C for primers BK1/F, BK2/R, and for primers DG74, RW01 57 °C, and 1 min s of extension at 72 °C. The final polymerisation step was prolonged to 10 min; the number of cycles was 30.

In ARDRA analysis, two restriction endonucleases, *AluI* and *TaqI*, were used for cleavage of PCR products (1039 bp) amplified using the primers BK1/F and BK1/R. PCR products were purified using carboxyl-functionalised magnetic P(HEMA-co-GMA) microspheres as given above. Magnetic (P(HEMA-co-GMA)) microspheres and DNA were eluted in a final volume of 50 µl.

The PCR products and digested amplicons were detected using agarose gel electrophoresis (1.8 %) in 0.5 x TBE buffer (45 mM boric acid, 45 mM Tris-base, 1 mM EDTA, pH 8). The 100 bp DNA ladder was used as standard. The DNA was stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml), decolourised in water, and observed on a UV transilluminator and photographed by digital camera.

Results

Domain- and genus-specific amplification of bacteria from commercial product and reference strains

At first, the standard phenol extraction procedure for bacterial DNA isolation was used. As the sensitivity of PCR was reduced or false-negative results occurred due to the presence of extracellular PCR inhibitors in the real sample, an alternative new procedure was used for DNA isolation. The magnetic P(HEMA-co-GMA) microspheres covered with carboxyl groups were applied for the isolation of PCR-ready DNA from crude cell lysates (without phenol extraction procedure), reference strains (control), and strains isolated from the commercial product. The same magnetic hydrophilic microspheres were previously used for the isolation of high-molecular weight bacterial PCR-ready DNA from different real samples with success (12-14). The specificity of the universal primer pair for the *Bacteria* domain and of the primer pair for the *Bacillus* genus was confirmed by PCR using genomic DNA extracted from the bacteria of the commercial product and from DNA extracted from the reference *Bacillus* strains. An amplicon sized 370 bp (Fig. 1) or 1095 bp (Fig. 2) was amplified using universal and genus-specific primers, respectively.

Isolation and identification of *Bacillus* species isolated from commercial product

Bacillus species isolated from the SanyDuo commercial product were identified after cultivation of bacteria on agar plates. Two morphologically different types of colonies were observed and used for pure culture preparation. Species identification was performed by ARDRA using the enzymes *AluI* and *TaqI*. The amplicons were repurified using magnetic P(HEMA-co-GMA) microspheres before cleavage. The results are shown in Figs. 3 and 4. It was found out that the commercial product contains different *Bacillus* species (Figs. 3, 4). The ARDRA patterns were compared with the theoretical digestion maps generated by a simulated restriction digest of the published GenBank sequence (1). Using *TaqI* the following species were identified: *B. cereus* (700, 400 bp long fragments), and *B. subtilis* or *B. licheniformis* (500, 400, 200 bp long fragments). Using *AluI* the following species were identified: *B. subtilis* (420, 250, 200, and 50 bp long fragments) and *B. licheniformis* (800, 250 bp long fragments). From a comparison of the above-mentioned results it follows that two species, *B. subtilis* and *B. licheniformis*, were identified in the commercial product.

Discussion

Molecular techniques were used for phylogenetic and taxonomic studies of *Bacillus*. The domain-specific and genus-specific PCR together with the ARDRA method were used for identification of *Bacillus spp.* in the commercial product used for fat separators. Basing on the methods used, it was found out that the commercial products for fat separators contain two species of *Bacillus*. The ARDRA method is suitable and useful for differentiation of bacteria from different environmental samples. Bacterial DNA isolated by the newly designed carboxyl-functionalised magnetic nonporous poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) microspheres (P(HEMA-co-GMA)) was of high quality and compatible with PCR. In comparison with the phenol-chloroform method, this isolation of DNA is simple and prompt.

Conclusions

Newly designed carboxyl-functionalised magnetic nonporous poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) microspheres P(HEMA-co-GMA) were used for bacterial DNA isolation from complex samples. The quality of extracted DNA was checked by PCR. Two species of *Bacillus* were identified in the commercial product studied. The method proposed is fast and very expeditious (contrary to the phenol extraction procedure, which is time-consuming and laborious) without using toxic compounds such as phenol or chloroform.

Acknowledgements

The financial support of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, MSM 0021622415, is gratefully acknowledged.

Captures

Fig. 1

Agarose gel electrophoresis of domain-specific PCR products after amplification of genomic DNA of *Bacillus* strains: lane M: DNA standard, lane 1: *B. cereus* CCM 2010^T, lane 2: *B. subtilis* CCM 1999, lane 3: *B. licheniformis* CCM 2145^T, lane 4: *B. circulans* CCM 1611, lane 5: *B. megaterium* CCM 2037, lane 6: *B. mycoides* CCM 915, lane 7: *B. thuringiensis* CCM 19^T, lane 8: bacteria of commercial product

Fig. 2

Agarose gel electrophoresis of domain-specific PCR products after amplification of genomic DNA of *Bacillus* strains: lane M: DNA standard, lane 1: *B. cereus* CCM 2010^T, lane 2: *B. subtilis* CCM 1999, lane 3: *B. licheniformis* CCM 2145^T, lane 4: *B. circulans* CCM 1611, lane 5: *B. megaterium* CCM 2037, lane 6: *B. mycoides* CCM 915, lane 7: *B. thuringiensis* CCM 19^T, lane 8: bacteria of commercial product, lane 9: positive control (*B. licheniformis* CCM 2145^T)

Fig. 3

TaqI digest of PCR product amplified from different types of colonies: lane 1: first type of colony, lane 2: second type of colony, lane 3: non-cleaved PCR product, lane M: DNA standard

Fig. 4

AluI digest of PCR product amplified from different types of colonies: lane 1: first type of colony, lane 2: second type of colony, lane 3: non-cleaved PCR product, lane M: DNA standard

Fig. 1

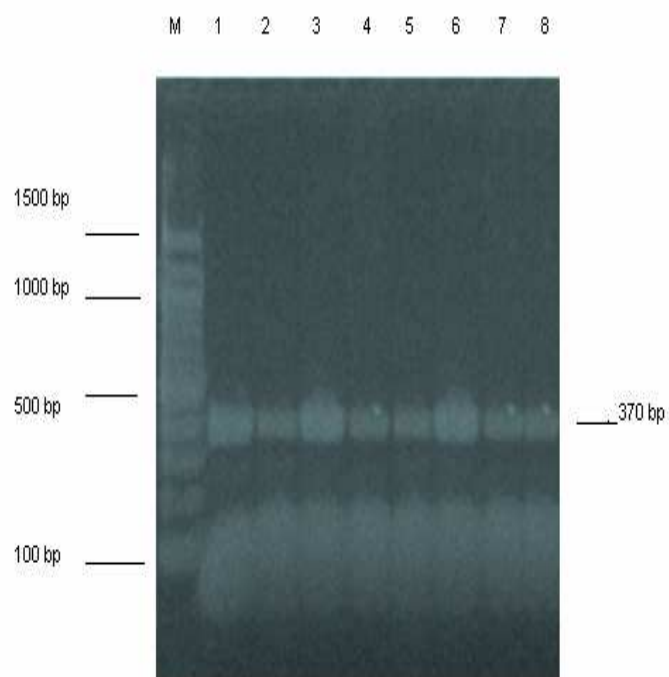


Fig. 2

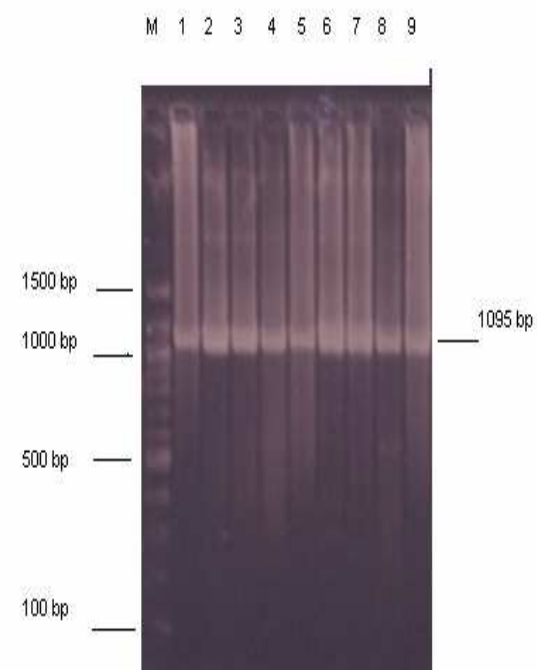


Fig. 3

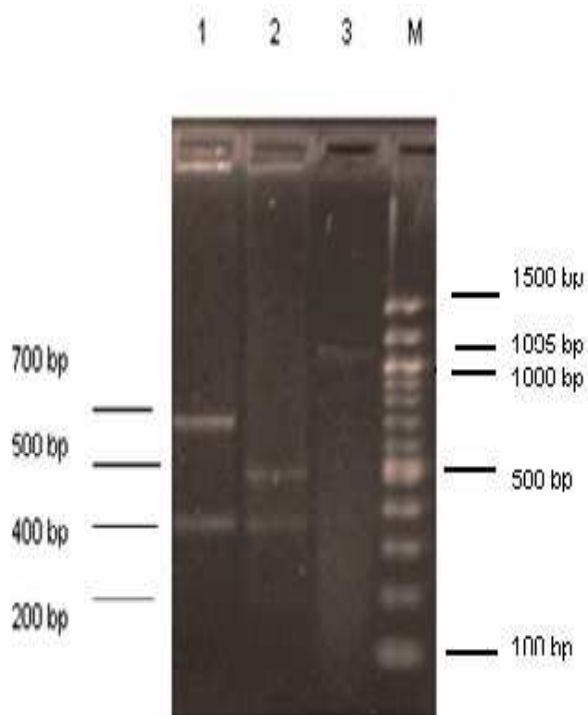
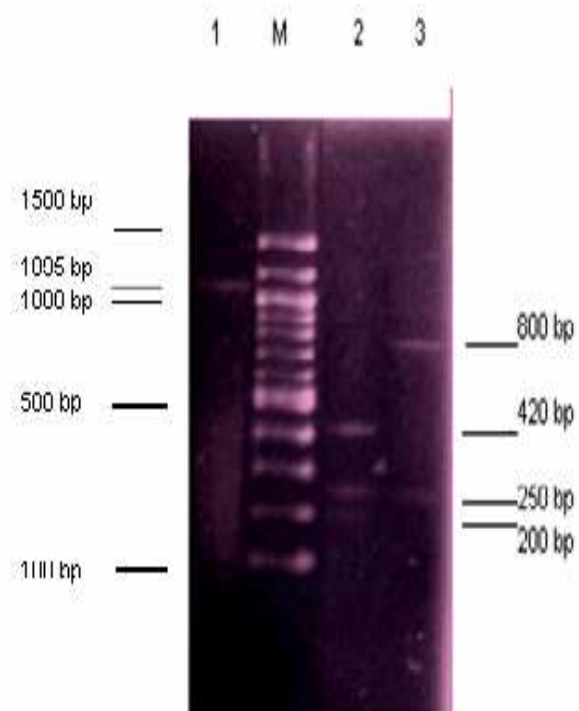


Fig. 4



References

1. Xi-Yang Wu, M. J. Walker, M. Hornitzky, J. Chin, *Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for identification of Bacillus species of environmental significance*, J. Microbiol. Methods 64 (2006) 107-119.
2. M. Schallmeyer, A. Singh, O. P. Ward, Can. J. Microbiol. 50 (2004) 1–17.
3. P. K. Sarkar, B. Hasenack, M. J. Nout, Int. J. Food Microbiol. 77 (2002) 175–186.
4. K. Illková, J. Omelková, Ž. Gojković, *Characterization of preparation for fat separators*, Nova Biotechnologica 3 (2009) 225-230.
5. H. Rodriguez, B. de las Rivas, R. Muñoz, Int. J. Food Microbiol. 115 (2007) 70–78.
6. M. M. Shah, H. Lihara, M. Noda, S. X. Song, P. H. Nhung, K. Ghkusu, Y. Kawamura, T. Ezaki, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57 (2007) 25–30.
7. J. Křížová, A. Španová, B. Rittich, D. Horák, J. Chromatogr. A 1064 (2005) 247-253.
8. B. Rittich, A. Španová, D. Horák, *Food Res. Inter.* 42 (2009) 493-498.
9. J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular cloning: a laboratory manual*. Volume I (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
10. R. R. Sinden, *DNA Structure and function*, Academic Press, San Diego, 1994, p. 34.
11. K. Greisen, M. Loeffelholz, A. Purohit, D. Leong, J. Clin. Microbiol. 32 (2004) 355-361.
12. B. Rittich, A. Španová, D. Horák, M. J. Beneš, L. Klesnilová, K. Petrová, A. Rybníkář, Colloids Surf. B: Biointerfaces 52 (2006) 143-148.
13. A. Španová, B. Rittich, I. Štyriak, I. Štyriaková, D. Horák, J. Chromatogr. A 1130 (2006) 115-121.
14. B. Rittich, A. Španová, P. Šálek, P. Němcová, Š. Trachtová, D. Horák, D. J. Magn. Magn. Mat. 321 (2009) 1667-1670.

Izolace DNA z mléčných a probiotických výrobků pomocí magnetických mikročastic

Trachtová Štěpánka, Rittich Bohuslav

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118 , Brno

ÚVOD

Metody magnetické separace s využitím magnetických částic jsou řazeny mezi moderní bioseparační metody, které lze využít i pro separaci DNA z komplexních reálných vzorků biologického původu. Umožňují izolovat DNA o vysoké čistotě. Jsou založeny na reversibilní imobilizaci (adsorpci) DNA na pevnou fázi – magnetické částice.

Magnetické separační techniky s výhodou využívají tzv. superparamagnetické nano- a mikročastice. Superparamagnetické částice se vyznačují magnetickými vlastnostmi pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole, dojde-li k jeho odstranění, částice své magnetické vlastnosti ztrácejí. V nepřítomnosti magnetického pole nevykazují tzv. zbytkový magnetismus, v důsledku čehož nedochází k jejich následné nežádoucí agregaci. Biokompatibilní magnetické polymerní mikročastice jsou tvořeny magnetickým jádrem, které je nositelem magnetických vlastností a polymerní ochrannou vrstvou. Úkolem této vrstvy je ochrana magnetického jádra, zabránění jeho kontaktu s analytem a v neposlední řadě slouží k funkcionalizaci povrchu částic vhodnými ligandy za účelem specifické separace vybraných cílových látek.

Při izolaci DNA se osvědčily magnetické částice pokryté karboxylovými skupinami. Metoda magnetické separace DNA v prostředí PEG 6000 a NaCl (DNA se adsorbuje v kondenzovaném stavu¹⁻³), byla úspěšně použita na izolaci chromosomální DNA v kvalitě vhodné pro PCR z různých druhů bakteriálních buněk⁴⁻⁶ a rozdílných typů komplexních vzorků, včetně různých potravin^{7,8} obsahujících inhibitory PCR. V porovnání s klasickými izolačními metodami je práce s magnetickými částicemi rychlá, jednoduchá, dostatečně citlivá, bezpečná. Tato metoda je v plné míře využitelná nejen v laboratorních podmínkách, ale také v každodenní výrobní praxi.

Cíl práce

Cílem práce byla izolace DNA z různých typů komplexních reálných vzorků, jako jsou mléčné výrobky (jogurt, mléčné nápoje), probiotické doplňky stravy a mléčné náhrady s použitím magnetických mikročastic s následným ověřením kvality DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

MATERIÁL A METODY

Chemikálie a zařízení

Agarosa byla dodána firmou Serva (Heidelberg, Germany), ethidium bromid firmou Sigma (St. Louis, Missouri, USA). Primery pro PCR byly syntetizovány ve firmě Generi-Biotech (Hradec Králové, ČR); *TaqI* DNA polymerasa a SYBR Green-q-PCR kit byly od firmy (Top-Bio, Praha, ČR). DNA marker (100 bp žebříček) pro gelovou elektroforézu byl z Malamité (Moravské Prusy, ČR). PEG 6000 byl dodán firmou Sigma (St. Louis, USA). Ostatní chemikálie byly čistoty p.a. a pocházely z běžných komerčních zdrojů.

Bakteriální kmen *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* CCDM 211 byl získán ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora (CCDM, Tábor, ČR); kmen *Lactobacillus gasseri* K7 byl získán ze Sbírký mikroorganismů Chair of Dairy Science, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Slovinsko. Seznam analyzovaných výrobků, které byly zakoupeny v komerční síti, je uveden v Tabulce 1.

Magnetické P(HEMA-co-GMA) (1/1 hm/hm) mikročástice byly připraveny disperzní kopolymerizací 2-hydroxyethyl-methakrylátu (HEMA) a glycidyl methakrylátu (GMA) v přítomnosti koloidního magnetitu (Fe_3O_4), stabilizovaného kyselinou olejovou⁹. Průměr částic byl 2,2 μm ; obsah karboxylových skupin 2,61 mmol/g. Částice byly připraveny na Makromolekulárním ústavu AV ČR v Praze Ing. Danielem Horákem, CSc.

Dále byly použity následující přístroje a pomůcky: magnetický separátor Dynal (Oslo, Norsko). DNA thermo cycler Rotorgene 6000 (Corbett Research, Austrálie), vana pro horizontální agarosovou gelovou elektroforézu (Bio-Rad, USA), UltraLum EB-20E UV transilluminator (Paramount, USA) pro vizualizaci PCR produktů, UV/Vis NanoPhotometer (Implen, Německo).

Příprava hrubých lyzátů buněk

Hrubé lyzáty buněk byly připraveny z vybraných reálných výrobků. V případě tekutých výrobků byl pro přípravu hrubých lyzátů buněk odebrán 1 ml vzorku po předchozí homogenizaci. Pokud byl vzorek ve formě tablety nebo prášku, byl do sterilní Eppendorfovy zkumavky navážen 1 g vzorku. Takto připravený vzorek byl resuspendován v 1 ml sterilní vody. Po centrifugaci (10 000 ot/5 min) byl supernatant slit a sediment obsahující buňky byl opětovně resuspendován v 1 ml roztoku A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0). Po opakované centrifugaci byl sediment resuspendován v 500 μl lyzačního roztoku (lysozym 5 mg/ml, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0). Vzorky byly ponechány při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny, poté bylo k vzorkům přidáno 25 μl 10 % SDS a 5 μl proteinasy K (100 $\mu\text{g/ml}$) a vzorky byly inkubovány při teplotě 55 °C do druhého dne.

Hrubé lyzáty buněk kontrolních bakteriálních kultur byly připraveny z 1 ml bakteriální kultury *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* CCDM 211 a *Lactobacillus gasseri* K7, které byly použity jako kontrola. *Lactobacillus gasseri* K7 připravené kultivací na MRS mediu při teplotě 37 °C/24 hodin. Sedimenty buněk byly následně zpracovávány stejným způsobem jako při přípravě hrubých lyzátů z reálných vzorků.

Adsorpce DNA z reálných vzorků na magnetické mikročástice

Jednotlivé komponenty separační směsi (100 μl magnetických částic o koncentraci 2mg/ml, 100 μl hrubého lyzátu buněk, 400 μl PEG 6000 a 400 μl 5 M NaCl) byly smíchány (konečný objem byl 1000 μl), po 15 minutové inkubaci byly pomocí magnetu odseparovány magnetické nosiče s navázanou DNA. Při izolaci DNA byly testovány separační směsi obsahující 16% PEG 6000 a 8% PEG 6000. Nosiče s DNA byly následně promyty 1000 μl a 500 μl 70% ethanolu a po odseparování magnetem sušeny v termostatu do odpaření ethanolu. Eluci do 50 μl TE pufru (15 min) byla z magnetických mikročástic uvolněna DNA. Pomocí vnějšího magnetického pole byly z roztoku odstraněny magnetické částice a byl odebrán supernatant s DNA. Kvalita a množství izolované DNA byla ověřena spektrofotometricky.

Konvenční polymerázová řetězová reakce

Amplifikovatelnost DNA izolované magnetickými mikročasticemi byla ověřena pomocí PCR za využití primerů specifických pro doménu *Bacteria*¹⁰ (velikost produktů PCR 490 bp) a primerů specifických pro rod *Lactobacillus*¹¹ (velikost produktů PCR 250 bp).

Směs pro PCR při použití primerů pro doménu *Bacteria* obsahovala 0,5 µl 10 mM dNTP, 1 µl (10 pmol/µl) každého primeru, 1 µl Taq 1.1 polymerasy (1 U/µl), 2,5 µl 10xPCR reakčního pufru (1,5 mM Mg²⁺ iontů) a 1 µl DNA. Celkový objem použité PCR směsi byl 25 µl (konečný objem byl doplněn vodou pro PCR). V případě specifických primerů pro rod *Lactobacillus* se složení PCR směsi odlišovalo v množství použitých primerů, které bylo 0,5 µl (10 pmol/µl) každého primeru.

Amplifikace DNA byla provedena za následujících podmínek: počáteční denaturace 5 min/95 °C, denaturace 30 s/95 °C, připojení primerů 30 s/55 °C a hybridizace 30 s/72 °C. Na závěr byla polymerizace v posledním cyklu PCR prodloužena na 10 minut. Celkový počet cyklů byl 30.

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Kvantifikace DNA, izolované pomocí magnetických mikročastic, byla provedena pomocí PCR v reálném čase za využití primerů specifických pro doménu *Bacteria*¹⁰ a rod *Lactobacillus*¹¹. Směs pro PCR obsahovala 12,5 µl qPCR SYBR Green master mixu, po 1 µl primerů (10 pmol/µl) specifických pro rod *Lactobacillus* nebo doménu *Bacteria* a 1 µl vzorku DNA. Směs byla doplněna vodou pro PCR na objem 25 µl. Program amplifikace byl shodný s konvenční PCR. Poté následoval tzv. melting program (analýza křivek tání) pro ověření specifiky amplikonů, během kterého byla teplota zvyšována od 50 °C do 95 °C. Pro kvantifikaci byla použita metoda absolutní kvantifikace, využívající kalibrační křivku, ze které je přímo odečítáno množství kopií DNA v analyzovaných vzorcích. Pro sestavení kalibrační křivky byla použita purifikovaná DNA bakteriálního kmene *Lactobacillus gasseri* K7. Kalibrační řada obsahovala DNA v množství 100 ng/µl, 10 ng/µl, 1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl a 1 pg/µl.

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí softwaru PCR cykleru Rotorgene 6000 (verze 1.7.87). Odpovídající množství DNA bylo vypočteno pomocí Ct hodnoty z kalibrační křivky. Hodnota Ct (práh detekce) představuje cyklus na počátku exponenciální fáze amplifikace, v němž došlo k překročení prahové hodnoty fluorescence. Reakční účinnost (r. e.) byla vypočtena pomocí lineární regrese sklonu amplifikačních křivek (M)

$$r. e. = 10^{(-1/M)} - 1$$

Robustnost metody byla odhadnuta na základě korelačního koeficientu lineární regrese (R²).

Testování inhibičního vlivu magnetických mikročastic na průběh PCR

Možnost interference magnetických polymerních mikročastic P(HEMA-co-GMA) v PCR byla studována na základě amplifikace DNA *Lactobacillus gasseri* K7 o koncentraci 10 ng/µl v přítomnosti různého objemu nanočastic v PCR směsi. Jako kontrola byly použity vzorky obsahující pouze purifikovanou DNA bez přítomnosti magnetických částic ve směsi pro PCR. Při PCR byly využity primery specifických pro doménu *Bacteria* a pro rod *Lactobacillus*¹¹.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Testování inhibičního vlivu magnetických mikročastic na průběh qPCR

Byla porovnávána účinnost amplifikace purifikované DNA v přítomnosti rozdílného množství mikročastic v PCR směsi a bez jejich přítomnosti. Na základě dosažených hodnot C_t v PCR směsi bylo provedeno vyhodnocení interference částic v PCR. Bylo zjištěno, že reakční účinnost (hodnota $r. e.$) v přítomnosti různého množství částic byla shodná pro standard DNA a testované směsi DNA s rozdílným množstvím částic. Na základě těchto výsledků bylo prokázáno, že za uvedených experimentálních podmínek 5 μ l a méně roztoku mikročastic (2mg/ml) v celkovém objemu PCR směsi 25 μ l neovlivňuje průběh amplifikace a tudíž ani kvantifikaci DNA u PCR v reálném čase.

Izolace DNA z reálných vzorků magnetickými mikročasticemi

Metoda magnetické separace byla použita pro izolaci DNA z hrubých lyzátů buněk reálných vzorků. K izolaci DNA byla použita směs s 16% PEG 6000 a 2M NaCl. Pomocí této směsi bylo izolováno větší množství DNA než pomocí směsi s 8% PEG 6000. DNA eluovaná z částic byla následně použita jako matrice do PCR a qPCR. Celkem bylo testováno 11 reálných komplexních vzorků (4 mléčné výrobky, 4 typy mléčných náhrad, 3 druhy probiotických doplňků stravy) – viz Tabulka 1. Za podmínek izolace byla ze všech reálných vzorků izolována DNA v dostatečném množství a relativní čistotě (Tabulka 1). Po amplifikaci byly ve všech vzorcích detegovány specifické produkty PCR o velikosti 490 bp, respektive 250 bp. Intenzity produktů PCR odpovídaly množství DNA ve směsi PCR. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 1.

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Kvantifikace DNA izolované pomocí magnetických mikročastic byla u analyzovaných vzorků provedena pomocí PCR v reálném čase za využití primerů specifických pro doménu *Bacteria*¹⁰ a rod *Lactobacillus*¹¹. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 2. Množství DNA bylo řádově shodné s očekávaným množstvím cílové DNA.

Analýzou křivek tání byla potvrzena specifita získaných produktů PCR. Pro PCR produkt o velikosti 490 bp (doména *Bacteria*) byla teplota tání stanovena na ≈ 90 °C; pro produkt PCR o velikosti 250 bp (rod *Lactobacillus*) byla teplota tání ≈ 85 °C.

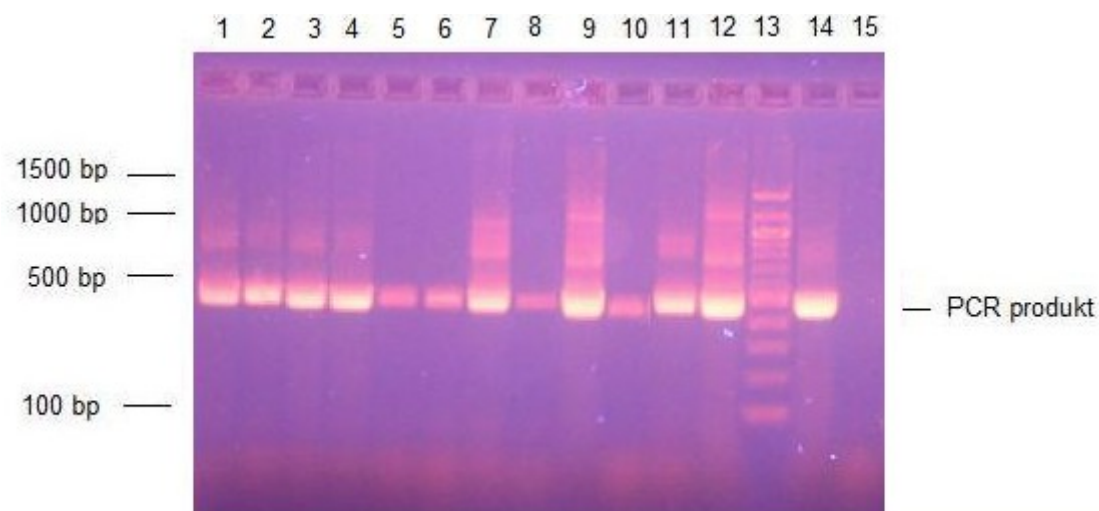
ZÁVĚR

Metoda magnetické separace využívající magnetické mikročastice je vhodnou metodou izolace genomové DNA z reálných vzorků (mléčných výrobků, mléčných náhrad, probiotických doplňků stravy). Vypracovaná metoda magnetické separace je vhodná pro kvantifikaci DNA izolované z komplexních vzorků pomocí PCR v reálném čase. Za použitých experimentálních podmínek magnetické mikročastice neovlivňovaly průběh amplifikace ani kvantifikaci DNA u PCR v reálném čase.

LITERATURA

1. Vasilevskaya, V. V., Khokhlov, A. R., Matsuzawa, Y., Yoshikawa, K. J. Chem. Phys. 102 (1995) 6595.
2. Kleideiter, G., Nordmeier, E. Polymer 40 (1999) 4025.
3. Esumi, K., Nakaie, Y., Sakai, K., Torigoe, K. Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects 194 (2001) 7.
4. Křížová, J., Španová, A., Rittich, B., Horák, D. J. Chromatogr. A 1064 (2005) 247.
5. Španová, A., Rittich, B., Štyriak, I., Štyriaková, I., Horák, D. J. Chromatogr. A, 1130 (2006) 115.
6. Španová, A., Rittich, B., Beneš, M. J., Horák, D. J. Chromatogr. A, 1080 (2005) 93.
7. Rittich, B., Španová, A., Horák, D., Beneš, M. J., Klesnilová, L., Petrová, K., Rybníkář, A. Colloids Surf. B: Biointerfaces 52 (2006) 143.
8. Rittich, B., Španová, A., Šálek, P., Němcová, P., Trachtová, Š., Horák, D. J. Magn.Magn. Mater. 321 (2009) 1667.
9. Horák, D., Semenyuk, N., Lednický, F., J. Polym. Sci., Polym. Chem.Ed. 41 (2003) 1848.
10. Haarman, M., Knol, J. Appl. Environ. Microbiol. 72 (2006) 2359.
11. Dubernet S., Desmaures N., Guéguen M.: FEMS Microbiol. Letters 214 (2002) 271.

Obr. 1: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR (490 bp) specifických pro doménu *Bacteria*



Běh č.: (1) Activia, příchut' lesní plody, (2) Activia bílá, (3) Zott bílý, (4) Bílý jogurt z ovčího mléka, (5) Beba premium, (6) Baby lactum, (7) Hipp folgemilch, (8) Biopron junior, (9) Junior mléko BIFIDUS, (10) Pangamin, (11) Linex forte, (12) DNA standard -100 bp žebříček, (13) pozitivní kontrola DNA *Lactobacillus gasseri* K7 - 10 ng/μl, (14) negativní kontrola.

Tabulka 1: Koncentrace a čistota DNA izolované pomocí magnetických mikročásteček z hrubých lyzátů buněk výrobků

Číslo	Výrobek	Koncentrace DNA (ng/μl)	A _{260nm} /A _{280nm}
1	Activia, příchut' lesní plody	26,8	1,84
2	Activia bílá	25,0	1,80
3	Zott bílý	21,0	1,68
4	Bílý jogurt z ovčího mléka	21,3	1,80
5	Beba premium	10,0	1,84
6	Baby lactum	25,5	1,91
7	Hipp folgemilch	35,2	1,67
8	Biopron Junior	42,0	1,87
9	Junior mléko BIFIDUS	10,5	1,78
10	Pangamin	30,3	1,94
11	Linex forte	60,3	1,98

A_{260nm}/A_{280nm} poměr absorbancí DNA

Tabulka 2: Kvantifikace DNA izolované z výrobků metodou magnetické separace pomocí PCR v reálném čase s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*.

Výrobek	Ct	DNA <i>Lactobacillus</i> (ng/PCR směs)
Activia, příchut' lesní plody	16,39	0,19
Activia bílá	16,40	0,23
Zott bílý	16,03	0,32
Bílý jogurt z ovčího mléka	16,42	0,27
Beba <u>premium</u>	16,74	0,20
Baby <u>lactum</u>	16,45	0,24
Hip folgemilch	16,69	0,20
Biopron Junior	16,48	0,24
Junior mléko BIFIDUS	-	0,00
Pangamin	16,06	0,27
Linex forte	15,57	0,52

ABSTRAKT

Cílem práce bylo ověřit použití magnetických mikročástic P(HEMA-*co*-GMA) pro izolaci DNA z mléčných výrobků, mléčných náhrad a probiotických doplňků stravy. Kvalita a množství izolované DNA byla ověřena spektrofotometricky, pomocí PCR, včetně PCR v reálném čase (qPCR). Za použitých experimentálních podmínek byla z různých výrobků izolována DNA vhodná pro identifikaci bakterií pomocí PCR. Magnetické mikročástice neovlivňovaly průběh amplifikace ani kvantifikaci DNA u PCR v reálném čase.

ABSTRACT

The aim of the paper was to test the application of magnetic P(HEMA-*co*-GMA) microparticles for DNA isolation from milk products and probiotic food supplements. Quality and quantity of isolated DNA was verified spectrophotometrically, by PCR, including real-time PCR (qPCR). Under used experimental conditions was from different products isolated PCR-ready DNA. The magnetic microparticles did not influence the course of PCR and the quantification of DNA using qPCR.

Klíčová slova

magnetické mikročástice P(HEMA-*co*-GMA), izolace DNA, polymerázová řetězová reakce (PCR), mléčné výrobky

Key words

magnetic P(HEMA-*co*-GMA) microparticles, DNA isolation, polymerase chain reaction (PCR), dairy products

Silica coated $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ nanoparticles for magnetically driven DNA isolation

Štěpánka Trachtová^a, Ondřej Kaman^b, Alena Španová^{a,c}, Pavel Veverka^b, Emil Pollert^b,
Bohuslav Rittich^{a,c,*}

^aBrno University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyňova 118, CZ-612 00 Brno, Czech Republic;

^bInstitute of Physics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Cukrovarnická 10/112, CZ-162 53 Prague 6, Czech Republic;

^cMasaryk University, Faculty of Science, Department of Experimental Biology, Kotlářská 2, CZ-611 37 Brno, Czech Republic

Running title: Silica coated nanoparticles for magnetically driven DNA isolation

* **Corresponding author:** E-mail: rittich@sci.muni.cz; rittich@fch.vutbr.cz
Tel: 00420 549496752

List of abbreviations

Ct - the crossing point (threshold cycle) in real-time PCR

LSMO(0.25)@SiO₂ - lanthanum manganese perovskite $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$, covered by a silica shell

PCR – polymerase chain reaction

Abstract

Magnetic $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ nanoparticles possessing an approximately 20 nm thick silica shell (LSMO(0.25)@SiO₂) were characterised and tested for the isolation of PCR-ready bacterial DNA. The results presented here show that the nanoparticles do not interfere in PCR. DNA was apparently reversibly adsorbed on their silica shell from the aqueous phase system (16 % PEG 6000 – 2 M NaCl). The method proposed was used for DNA isolation from complex food samples (dairy products and probiotic food supplements). The isolated DNA was compatible with PCR. The main advantages of the nanoparticles tested for routine use were their high colloidal stability allowing a more precise dosage and therefore high reproducibility of DNA isolation.

Keywords: DNA isolation; lanthanum manganese perovskite; nanoparticles; PCR; silica shell

1. Introduction

In vitro amplification of nucleic acids using the polymerase chain reaction (PCR) has become a powerful diagnostic tool for the analysis of microorganisms. However, the sensitivity of PCR may be reduced when complex biological samples are studied, since various extracellular PCR inhibitors may be present [1]. The problem can be solved by means of various DNA isolation and purification methods. A classical procedure for the isolation of genomic DNA involves phenol/chloroform extraction and DNA precipitation in ethanol [2]. The application of this method in DNA isolation could be a time-consuming work, especially if many samples are tested. Rapid and sophisticated isolation strategies are based on the utilisation of solid-phase magnetic systems selectively or non-selectively adsorbing cells or DNA [3-8].

During the synthesis of magnetic microparticles the following drawbacks must be solved: inhomogeneous distribution of the magnetic cores inside the microparticles and presence of free non-encapsulated magnetic nanoparticles. The disadvantage of magnetic microparticles for routine use is their sedimentation during the separation process, which influences the reproducibility of DNA isolation. For this reason, research has been focused on the development of innovative magnetic nanoparticles [9, 10] with high colloidal stability, which enables precise dosage of particles. We focused our study interest on the nanoparticles of the ferromagnetic $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$, covered by a silica shell - $\text{LSMO}(0.25)@\text{SiO}_2$. These nanoparticles were found to be interesting for several reasons: relatively high magnetisation accelerating separation and weak remnant magnetisation limiting the tendency to agglomeration after the application of a magnetic field. Simultaneously, the silica shell provides a high stability of the suspension of well-dispersed particles [11, 12].

The solution of poly(ethylene glycol) (PEG) with different salts can be used for the precipitation of DNA, as was already described [2, 13]. Similarly, reversible DNA adsorption on the surface of magnetic microparticles carrying carboxyl groups was used for the isolation of short DNA fragments [14, 15]. In previously published papers [16, 17], magnetic silica particles were successfully used for the isolation of DNA from various samples containing PCR inhibitors. Similar properties were expected for $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ nanoparticles coated by a silica shell, not tested for DNA isolation yet. Therefore, we now aimed our attention at the investigation of magnetically driven isolation of PCR-ready DNA using silica-coated $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ nanoparticles.

2. Methods

2.1. Chemicals and microorganisms

Agarose was purchased from Serva (Heidelberg, Germany), ethidium bromide and PEG 6000 from Sigma (St. Louis, Missouri, USA). The PCR primers were synthesised by Generi Biotech (Hradec Králové, Czech Republic); *Taq* polymerase was supplied by Top-Bio (Prague, Czech Republic), and the DNA marker (100 bp ladder) for gel electrophoresis was from Malamité (Moravské Prusy, Czech Republic). Real-time PCR was performed using the SyberGreen-q-PCR kit (Top-Bio, Prague, Czech Republic). Commercially supplied ordinary chemicals and solvents were of analytical grade.

Dairy products (yoghurts, fermented milk products) and food supplements were obtained on the Czech market. The DNA for positive control of amplification in PCR was isolated

from *Lactobacillus gasseri* K7 obtained from a culture collection of the Chair of Dairy Science, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Slovenia.

2.2. Equipment

Magnetic particles were separated on the Dynal MPC-M magnetic particle concentrator (Oslo, Norway). DNA was amplified in the DNA thermal cycler Rotorgene 6000 (Corbett Research, Mortlake, Australia). Agarose gel electrophoreses were carried out using a standard electrophoresis unit (Bio-Rad, Richmond, USA). The PCR products were visualised on the UltraLum EB-20E UV transilluminator (Paramount, USA) at 305 nm and photographed with a digital camera. The UV spectrophotometry of DNA was carried out on the UV/Vis NanoPhotometer (Implen, München, Germany).

2.3. Silica coated $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ nanoparticles ($\text{LSMO}(0.25)@\text{SiO}_2$)

The synthesis of $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ cores embedded by silica providing stability of water-based colloidal suspension consists of two subsequent steps: synthesis of cores via sol-gel technique employing citric acid and ethylene glycol, subsequent evaporation of water, drying, calcination and annealing at given temperatures, followed by the mechanical treatment stabilisation of water-based colloidal suspension by the encapsulation of the cores by silica using tetraethoxysilane (TEOS) in a mixture of ethanol and water alkalised by ammonia. The encapsulation procedure is described in detail elsewhere [18, 19]. The manganese content in the final suspension of the particles was determined photometrically at a wavelength of 526 nm [19]. The manganese ions were oxidised to permanganates and the absorption spectra were measured on a spectrophotometer (UNICAM UV300). The content of $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ nanoparticles was calculated from Mn content (0.34 mg Mn/ml - 1.42 mg $\text{LSMO}(0.25)@\text{SiO}_2$ /ml). The size and morphology of $\text{LSMO}(0.25)@\text{SiO}_2$ nanoparticles were characterised by transmission electron microscopy (TEM; Philips EM 201 - 100 kV, tungsten cathode). Hydrodynamic sizes were determined by the method of dynamic light scattering using photon cross-correlation spectroscopy (Sympatec NANOPHOX apparatus, Clausthal-Zellerfeld, Germany) that suppresses multiple scattering. The measurements were carried out on stable water suspensions of nanoparticles coated by silica [20]. Static magnetic properties were measured by means of a SQUID magnetometer (MPMS-5S by Quantum Design, San Diego, USA) in the fields of up to 2 T and in the temperature range of 5 - 370 K [20]. Magnetic porous glass particles MPG (5 μm , CPG, New York, USA) were used for the comparison of DNA isolation under the same experimental conditions.

2.4. Methods

2.4.1. Preparation of crude cell lysates

Bacterial cells of the strain *Lactobacillus gasseri* K7 were cultivated on MRS agar aerobically at 37 °C. The bacterial cells were sedimented (10 000 g/5 min), washed with buffer solution (10 mM Tris-HCl, pH 7.8; 5 mM EDTA, pH 8.0), and resuspended in 500 μl of the same buffer containing lysozyme (5 mg/ml). After incubation at laboratory temperature for 1 h, 10 μl of proteinase K (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and 50 μl of sodium dodecyl sulphate (SDS) (10 % aqueous solution) was added, and the mixture was further incubated at 55 °C for 24 h.

2.4.2. DNA isolation from complex samples using magnetic nanoparticles

The products tested (1 g) were dispersed in 1 ml of sterile water and the bacterial cells present were washed twice with sterile water and lysed according to the procedure described

above (2.4.1.). A total of 50 µl of the crude cell lysate, 10 µl of the LSMO(0.25)@SiO₂ at a concentration of 0.34 mg Mn/ml - 1.42 mg LSMO(0.25)@SiO₂/ml) in the final suspension and the appropriate amount of the binding buffer (final concentration 16 % PEG 6000 and 2 M NaCl) were mixed and incubated for 10 min at laboratory temperature. Purified DNA (4 µg) in the separation mixture was taken as 100 %. Magnetic nanoparticles were separated on an MPC-M magnetic particle concentrator for 15 min. The DNA captured on the nanoparticles was washed twice using 500 µl of 70 % ethanol and eluted in 50 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.8) for 30 minutes. The DNA in the eluates was amplified by PCR. Simultaneously, the DNA isolated from *Lactobacillus gasseri* K7 by the phenol extraction procedure [2] was used as a positive control. The concentrations of the isolated DNA were estimated spectrophotometrically at 260 nm. The ratio of absorbances A_{260 nm}/A_{280 nm} was used as a test of nucleic acid purity [21]. The possible degradation of the nucleic acids was checked by gel electrophoresis (0.8 % agarose) in TBE buffer (45 mM boric acid, 45 mM Tris-base, 1 mM EDTA, pH 8.0). The DNA was stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml), decolourised in water and observed on a UV transilluminator.

2.4.3. PCR amplification and detection of PCR products

The DNA isolated using magnetic nanoparticles was used as the DNA matrix in PCR. The procedure was performed with primers Feub and Reub specific to the *Bacteria* domain [22]. Briefly: The PCR mixture contained 0.5 µl of 10 mM dNTP, 0.5 µl (10 pmol/µl) of each primer, 1 µl of Taq 1.1 polymerase (1 U/µl), 2.5 µl of PCR buffer with 1.5 mM Mg²⁺ ions and 1 µl of DNA matrix; PCR water was added up to a volume of 25 µl. The amplification reactions were carried out using the following cycle parameters: 5 min of the initial denaturation period at 95 °C (hot start), 30 s of denaturation at 95 °C, 30 s of primer annealing at 55 °C, and 30 s of extension at 72 °C [22]. PCR products (499 bp for the *Bacteria* domain) were detected using agarose gel electrophoresis (1.8 % agarose).

2.4.4. Real-time PCR

The DNA isolated from *Lactobacillus gasseri* K7 and from food samples was also used as DNA template in real-time PCR. Amplification was performed with the same primers and under the same conditions as standard PCR (see 2.4.3.). The reaction involved 12.5 µl of the mixture supplied, 1 µl of each primer, 9.5 µl of PCR grade water, and 1 µl of template DNA. The last polymerisation step was followed by a melting curve analysis from 50 to 99 °C (held 1 s in the 1st step and 5 s in the following steps). A negative control (without DNA) and a positive control (10 ng/µl of DNA) were included in each plate.

The software supplied with the real time-PCR, a Rotorgene 6000 cycler (version 1.7.87), was used for the statistical evaluation of the data. The crossing point (threshold cycle, Ct) was calculated as the cycle number at which the reaction reached the threshold value (Tv) at the beginning of the exponential phase of the amplification curve. The dilution method was used for the study of the influence of the nanoparticles and the DNA extraction procedure on the efficiency of amplification.

The reaction efficiency (r. e.) was calculated using linear regression from the slope (M) of the plot Ct versus log of nucleic acid concentration using the equation

$$\text{r. e.} = 10^{(-1/M)} - 1 \quad (1)$$

The corresponding amount of DNA was calculated from the Ct values using a standard curve obtained after amplification of DNA isolated from *Lactobacillus gasseri* K7. The correlation coefficient of the linear regression (R^2) was used for the validation of linearity between DNA concentrations and Ct values.

3. Results and Discussion

3.1. Characterisation of nanoparticles

The observed size of the grains determined by X-ray diffraction was found to be approximately 20 nm while the image analysis of the TEM data in [11] provided a rough estimation of the core size being ~57 nm for the same samples; see Fig. 1. These observations indicate that the cores of the coated particles consist of connate or physically aggregated crystallites rather than of single crystallites. On the contrary, the hydrodynamic data correspond to the entire diameter of the coated particles including the surface layer of the absorbed water. From the viewpoint of DNA separation, the hydrodynamic size is more important since it involves the overall size of the particles including the hydration sphere in the aqueous phase providing the colloidal stability of the suspension. The hydrodynamic size distribution (d) of the LSMO(0.25)@SiO₂ nanoparticles can be described by the following quantities: $d_{10\%} = 111$ nm, $d_{50\%} = 135$ nm, $d_{90\%} = 163$ nm, where the subscript designates the fraction of the particles with the hydrodynamic size lower than the given value. The magnetic properties of the product are characterised first and foremost by the Curie temperature $T_C = 335$ K, lying slightly above the laboratory temperature, magnetisation (M) of bare particles: $M_{750kAm^{-1}} = 23.7$ Am²/kg and 8.8 Am²/kg of an LSMO(0.25)@SiO₂ dry sample, and low remnant magnetisation (M_r) (bare particles: $M_r \approx 0.7$ Am²/kg; LSMO(0.25)@SiO₂: $M_r \approx 0.1$ Am²/kg). The low Curie temperature allows removing easily their weak remnant magnetisation by a slight heating only above ~ 65 °C. Under neutral pH the surface of such particles exposes both the silanol groups Si-OH and deprotonated silanol groups Si-O⁻ generating a negative zeta potential [19]. The surface is hydrophilic and strongly hydrated but it also has a significant ability to form multiple hydrogen bonds comprising both the hydrogen bond donors and the acceptor. The nanoparticles were stable in the form of a suspension and no sedimentation was observed.

3.2. Influence of nanoparticles on PCR course

In previously published papers [23, 24], the effect of various microspheres, including magnetic ones or individual components used in their preparation, on PCR sensitivity was tested. The method enables indirect verification of incorporation of magnetite nanoparticles in the microspheres and evaluation of the applicability of individual magnetic carriers in PCR. The results obtained are semiquantitative. For this reason, real-time PCR was used for an estimation of the PCR interference by comparing the amplification efficiencies of DNA containing the LSMO(0.25)@SiO₂ nanoparticles with the DNA standards free of any nanoparticles.

If the efficiency of PCR is 100 %, the slope of the curve will be $M = -3.33$. Generally, a reaction efficiency of PCR between 80 and 110 % ($-3.9 > \text{slope} > -3.0$) is acceptable. From the results given in Table 1 it follows that the reaction efficiencies were approximately the same for the DNA standards (100 ng to 1 pg/25 µl of PCR mixture) and the DNA mixed with

LSMO(0.25)@SiO₂ (0-12.78 µg particles/25 µl of PCR mixture corresponding to 0-9 µl of particle suspension). The linear regression was used for the calculation of M in Equation (1). If R² is ≤ 0.9850, the assay does not give reliable results. All of the concentrations of nanoparticles tested in the present study provided data characterised by a correlation with R² values higher than 0.99 (Table 1). The results presented here show that the nanoparticles did not interfere in PCR and can be used for the isolation of PCR-ready DNA.

3.3. DNA isolation using nanoparticles

In the previously published papers [16, 17], carboxyl coated_magnetic hydrophilic P(HEMA-co-GMA) microspheres, pure silica microparticles and the so-called magnetic glass particles, possessing the same silica surface, were successfully used for the isolation of DNA from different complex samples containing PCR inhibitors. Similarly, the currently employed LSMO(0.25)@SiO₂ nanoparticles should exhibit the same adsorption properties due to the hydrophilic silica shell. Various poly(ethylene glycol) (PEG 6000) and sodium chloride concentrations were used to optimise DNA adsorption. Condensation of DNA occurred under experimental conditions reported previously [25] and condensed DNA was adsorbed on the surface of solid magnetic nanoparticles (see below). The adsorbed DNA was eluted into TE buffer. The amount of purified DNA (4 µg) in the separation mixture (100 µl) containing 10 µl of the suspension of nanoparticles in water was taken as 100 %. Then, the highest recovery was 40.5 % for 16 % PEG 6000 and 2 M NaCl (Table 2). The results agree with those published in paper [16].

Under the low concentration of salts, DNA macromolecules are present in the form of random coils. The mechanism of DNA interaction with the microsphere surface is evidently complicated and was discussed in a previously published paper [16]. It is possible to assume that the mechanism of the reversible DNA adsorption on the particle surface is of a complex nature. The following influences can be taken into consideration in the process of DNA isolation: the DNA coils swell and condense to a compact and relatively dense state above the critical concentration of PEG and a high concentration of salts [25-28]. PEG presented in mixture (which is essentially non-polar) adsorbs on the silica surface through hydrogen bonding with surface silanol groups [29]. The authors [30] suppose that adsorption of condensed DNA on hydrophobised silica surface is accompanied by structural changes in the helices and more hydrophobic bases are available to interact with the hydrophobic surface. In analogy with the above-mentioned finding, it is possible to assume that nitrogen bases of DNA in collapsed state interact via electrostatic interactions with the surface of perovskite, which is coated with PEG. It is supposed that negatively charged phosphate groups do not significantly influence the interactions.

3.4. PCR amplification of DNA isolated using nanoparticles from complex samples

The method developed for magnetically driven PCR-ready DNA isolation (see 3.3.) from crude cell lysates (without phenol extraction procedure) utilising the nanoparticles tested was applied for the isolation of DNA from 8 various complex food samples containing lactic acid bacteria (yoghurts, fermented milk products, probiotic food supplements). The amounts of isolated DNAs using LSMO(0.25)@SiO₂ nanoparticles were lower than in the case of DNA isolated by magnetic glass particles (MPG). For example, using magnetic glass particles and LSMO(0.25)@SiO₂ nanoparticles, 20.8 ng DNA/µl and 25.0 ng DNA/µl respectively were isolated from the fermented milk product Activia white; using magnetic glass particles and

LSMO(0.25)@SiO₂ nanoparticles, 77.9 ng DNA/μl and 122.0 ng DNA/μl respectively were isolated from milk nutrition Hipp Folgenmilk; using magnetic glass particles and LSMO(0.25)@SiO₂ nanoparticles, 26.5 ng DNA/μl and 21.0 ng DNA/μl respectively were isolated from white yoghurt Zott. The amounts of eluted DNAs from the nanoparticles were lower than in the case of DNAs isolated by the phenol extraction method (results are not shown). DNA recovery was comparable with the previously published results with carboxyl coated magnetic P(HEMA-*co*-GMA) microspheres [16]. The amount of eluted DNA was sufficient for PCR amplification of target DNA. Examples of DNA amplification are given in Fig. 2. The isolated DNAs were successfully used as a matrix in PCR and real-time PCR. Only one PCR product was amplified in real-time PCR, which was demonstrated using the melting analysis of the amplification curves (results not shown). In comparison with carboxyl coated magnetic hydrophilic P(HEMA-*co*-GMA) microspheres and the so-called magnetic glass particles, the main advantage of the nanoparticles tested for routine use is their high colloidal stability allowing a more precise dosage (in comparison with micro-sized magnetic particles).

4. Concluding remarks

Various concentrations of poly(ethylene glycol) (PEG 6000) and sodium chloride were tested to optimise reversible DNA adsorption on the silica-coated nanoparticles of the La_{0.75}Sr_{0.25}MnO₃ perovskite manganite. DNA was apparently adsorbed on their silica shell from the aqueous phase system (16 % PEG 6000 – 2 M NaCl). The results presented here show that the nanoparticles tested do not interfere in PCR and can be used for the isolation of PCR-ready DNA from real food samples (dairy products, food supplements).

Acknowledgements

The financial support of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, grant No. 2B06053, projects ASCR KAN20020061 and KAN201110651, and a long-term research programme MSM 0021622415 of the Ministry of Education of the Czech Republic are gratefully acknowledged.

We declare that none of the authors has any financial or similar relationship with business based on the separations or any companies whose products and services are discussed in the manuscript.

References

- [1] Wilson, I. G., *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63, 3741-3751.
- [2] Sambrook, J., Russell, D.W., *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- [3] Španová, A., Rittich, B., Karpíšková, R., Čechová, L., Škapová, D., *Bioseparation*, 2001, 9, 379-384.
- [4] Španová, A., Rittich, B., Horák, D., Lenfeld, J., Pročkalová, J., Sučíková, J., Štrumcová, Š., *J. Chromatogr. A* 2003, 1009, 215-221.
- [5] Rittich, B., Španová, A., Horák, D., *Food Res. Int.* 2009, 42, 493-498.
- [6] Aguilar-Arteaga, K., Rodriguez, J. A., Barrado, E., *Anal. Chim. Acta* 2010, 674, 157-165.
- [7] Horák, D., Babič, M., Macková, H., Beneš, M. J., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 1751-1772.
- [8] Liu, L. J., Yu, S. B., Yang, S. X., Zhou, P., Hu, J. M., Zhang, X. B., *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 2752-2758.
- [9] Baptista, P., Pereira, E., Eaton, P., Doria, G., Miranda, A., Gomes, I., Quaresma, P., Franco, R., *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391, 943-950.
- [10] Corchero, L. J., Villaverde, A., *Trends Biotechnol.* 2009, 27, 468-476.
- [11] Kačenka, M., Kaman, O., Kotek, J., Falteisek, L., Černý, J., Jiráček, D., Herynek, V., Zacharovová, K., Berková, Z., Jendelová, P., Kupčík, K., Pollert, E., Veverka, P., Lukeš, I., *J. Mater. Chem.* 2011, 21, 157-164.
- [12] Pollert, E., Veverka, P., Veverka, M., Kaman, O., Závěta, K., Vasseur, S., Ephère, R., Goglio, G., Duguet, E., *Prog. Solid State Chem.* 2009, 37, 1-14.
- [13] Paithankar, K. R., Prasad, K. S. N., *Nucleic Acids Res.* 1991, 19, 1346.
- [14] Hawkins, T. L., O'Connor-Morin, T., Roy, A., Santillan, C., *Nucleic Acids Res.* 1994, 22, 4543-4544.
- [15] DeAngelis, M. M., Wang, D. G., Hawkins, T. L. *Nucleic Acids Res.* 1995, 23, 4742-4743.
- [16] Rittich, B., Španová, A., Šálek, P., Němcová, P., Trachtová, Š., Horák, D., *J. Magn. Mater.* 2009, 321, 1667-1670.
- [17] Kahánková, J., Španová, A., Pantůček, R., Horák, D., Doškař, J., Rittich, B., *J. Chromatogr. B* 2009, 877, 599-602.
- [18] Pollert, E., Kaman, O., Veverka, P., Veverka, M., Maryško, M., Závěta, K., Kačenka, M., Lukeš, I., Jendelová, P., Kašpar, P., Burian, M., Herynek, V., *Philos. Trans. R. Soc. A-Math. Phys. Eng. Sci.* 2010, 368, 4389-4405.
- [19] Kaman, O., Pollert, E., Veverka, P., Veverka, M., Hadová, E., Knížek, K., Maryško, M., Kašpar, P., Klementová, M., Gruenwaldová, V., Vasseur, S., Ephère, R., Mornet, S., Goglio, G., Duguet, E., *Nanotechnology* 2009, 20, ARTN 275610 (7 pp).
- [20] Kaman, O., Veverka, P., Jiráček, Z., Maryško, M., Knížek, K., Veverka, M., Kašpar, P., Burian, M., Šepelák, V., Pollert, E., *J. Nanopart. Res.* 2011, 13, 1237-1252.
- [21] Sinden, R. R., *DNA Structure and Function*, Academic Press, San Diego, 1994, p. 34.
- [22] Haarman, M., Knol, J., *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 2359-2365.
- [23] Španová, A., Horák, D., Soudková, E., Rittich, B., *J. Chromatogr. B* 2004, 800, 27-32.
- [24] Španová, A., Rittich, B., Beneš, M. J., Horák, D., *J. Chromatogr. A* 2005, 1080, 93-98.
- [25] Vasilevskaya, V. V., Khokhlov, A. R., Matsuzawa, Y., Yoshikawa, K., *J. Chem. Phys.* 1995, 102, 6595-6602.
- [26] Kleideiter, G., Nordmeier, E., *Polymer* 1999, 40, 4013-4023.

- [27] Kleideiter, G., Nordmeier, E., *Polymer* 1999, 40, 4025-4033.
- [28] Esumi, K., Nakaie, Y., Sakai, K., Torigoe, K., *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 2001, 194, 7-12.
- [29] Arakawa, T., Timasheff, S. N., *Biochemistry* 1985, 24, 6756-6762.
- [30] Eskilsson, K., Leal, C., Lindman, B., Miguel, M., Nylander, T., *Langmuir* 2001, 17, 1666-1669.

Captures

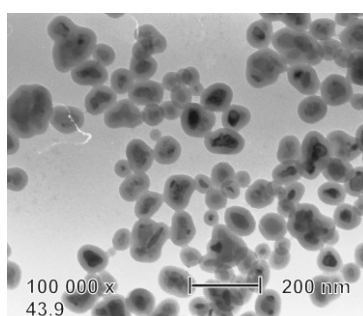


Fig. 1. Transmission electron microscopy of LSMO(0.25)@SiO₂ nanoparticles.

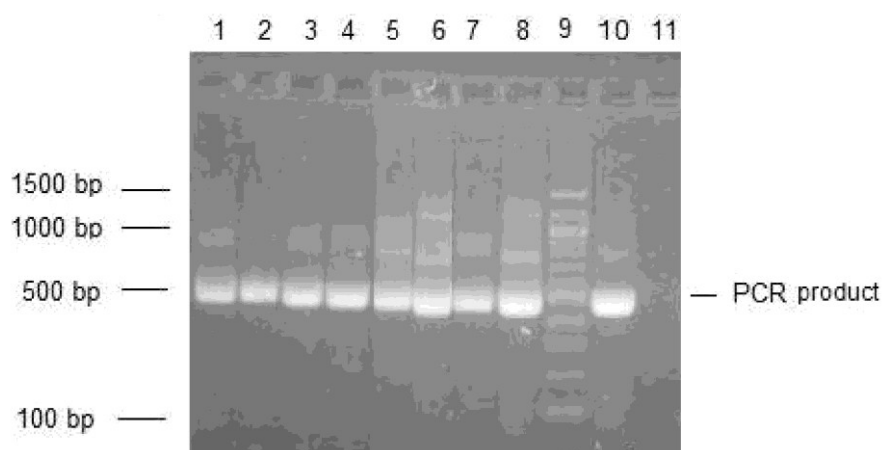


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products specific to the *Bacteria* domain (466 bp) amplified from 1 µl of DNA isolated using 10 µl of suspension of nanoparticles in water.

Conditions: 1.8 % agarose gel, TBE buffer (45 mM boric acid, 45 mM Tris-base, 1 mM EDTA, pH 8.0). Lanes: (1) fermented milk product Activia with fruits, (2) fermented milk product Activia white, (3) white yoghurt Zott, (4) yoghurt from sheep milk St. Pierre, (5) milk nutrition Hipp Folgenmilk, (6) food supplement probiotic complex Biopron junior, (7) food supplement Pangamin, (8) food supplement Linex forte, (9) DNA standard 100 bp ladder, (10) positive control (10 ng purified DNA *Lactobacillus gasseri* K7), (11) negative control (without DNA).

Table 1. The influence of nanoparticles on the efficiency of amplification in real-time PCR with Sybr Green (linear regression analysis)

<i>Nanoparticles</i> ($\mu\text{g}_{\text{LSMO}}/25 \mu\text{l}^*$)	<i>M</i>	<i>r. e. (%)</i>	<i>R²</i>	<i>c. v.</i> (%)
0	-3.1	108.0	0.9906	0.3 – 54.5
0.71	-3.2	103.9	0.99608	2.7 - 31.1
1.42	-3.4	98.2	0.99702	5.2 - 36.1
2.84	-3.3	99.9	0.9978	4.9 -20.6
4.26	-3.9	79.9	0.99628	11.4 -26.9
5.68	-3.2	100.7	0.9918	20.7-63.6
8.52	-3.0	114.0	0.9926	10.0-47.6
11.36	-3.4	97.9	0.9997	2.8-6.5
12.78	-3.4	97.1	0.9975	1.0-22.8

*PCR mixture, M - slope of regression curve, r. e. - reaction efficiency, R^2 - correlation coefficient, c. v. - coefficient of variance, c DNA = 0.00004 - 4.0 (ng/ μl),

Table 2. Recovery of DNA isolation using magnetic $\text{La}_{0.75}\text{Sr}_{0.25}\text{MnO}_3$ nanoparticles at different PEG 6000 and NaCl concentrations

<i>NaCl (M)</i>	<i>PEG 6000 concentration (%)</i>	
	<i>8.0</i>	<i>16.0</i>
<i>DNA recovery (%)</i>		
1,0	8.0	16.0
1,5	7.0	20.8
2,0	22.0	21.9
2,5	27.8	40.5